



TITLE:

京都大学再生医科学研究所年報 2009

AUTHOR(S):

CITATION:

京都大学再生医科学研究所年報 2009. 京都大学再生医科学研究所年報
2010, 12

ISSUE DATE:

2010-03-25

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/108669>

RIGHT:

京都大学

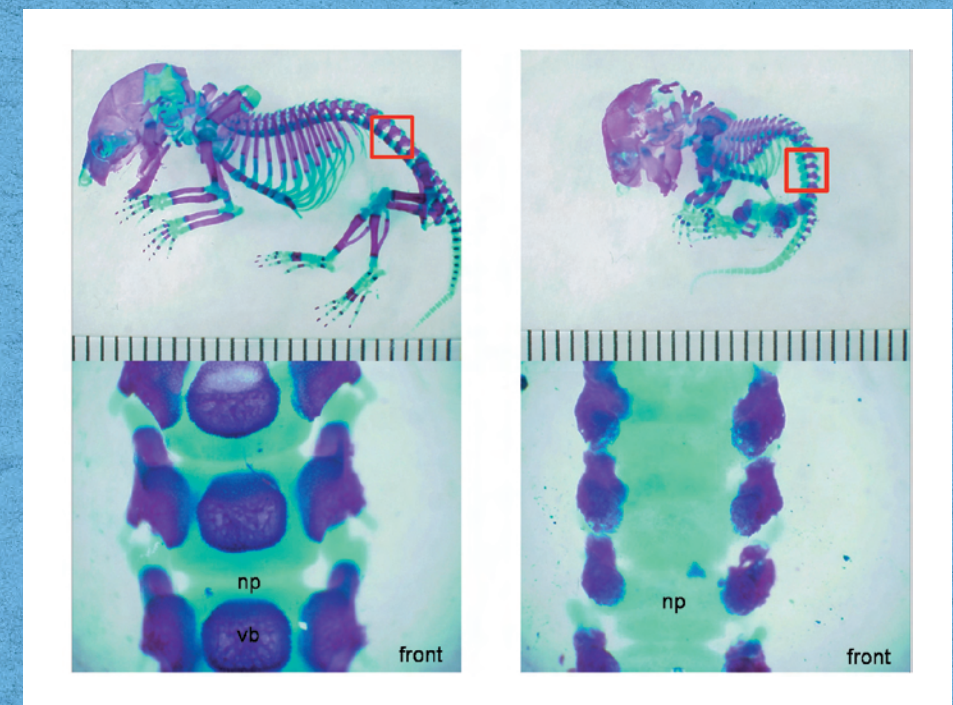
再生医科学研究所年報
(第12巻)

二〇〇九

京都大学

再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University



〈第12巻〉

2009
平成21年

目 次

1. 巻頭言	1
2. 京都大学再生医科学研究所概要	
2-1 沿革	2
2-2 教員数等	2
(1) 教員	2
(2) 大学院生・研修員・研究生等	2
2-3 組織図	3
3. 研究概要と研究業績	
生体機能学研究部門	
細胞機能調節学分野	4
生体微細構造学分野	11
生体機能調節学分野	13
生体システム制御学分野	19
生体再建学分野	22
生体組織工学研究部門	
生体分子設計学分野	26
生体材料学分野	30
組織修復材料学分野	52
生体物性学分野	59
再生統御学研究部門	
発生分化研究分野	67
再生誘導研究分野	72
再生増殖制御学分野	80
再生免疫学分野	84
再生医学応用研究部門	
生体修復応用分野	88
組織再生応用分野	92
器官形成応用分野	99
臓器再建応用分野	103
附属再生実験動物施設	112
附属幹細胞医学研究センター	
霊長類胚性幹細胞研究領域	117
幹細胞分化制御研究領域	120
幹細胞加工研究領域	128
細胞プロセッシング研究領域	132
再プログラム化研究領域	135
附属ナノ再生医工学研究センター	
ナノバイオプロセス研究領域	141
シミュレーション医工学研究領域	145
ナノバイオメカニズム研究領域	156
技術部	158
4. ナノメディシン融合教育ユニット	159
5. 学術集会	
5-1 京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 平成21年度 学術講演会	160
5-2 セミナー	163
5-3 研究発表会	165
5-4 学術講演会・シンポジウム・研究会等	166
6. 共同研究	168
7. 協議員・教職員・その他構成員名簿	171

1. 巻 頭 言

再生医科学研究所は、平成 20 年 10 月に、文部科学省から全国共同利用・共同研究拠点としての認定を受け、実質的には、平成 21 年度から、公募研究の推進、拠点シンポジウムの開催などの拠点活動を開始しました。全国の多くの大学附置研究所・センターと同じく、単なる大学附置研究所という位置付けから、個々の大学の枠を超えて研究者コミュニティに開かれた共同研究の場としての役割を意識的に果たす方向に動こうとしています。限られた財政支援のなか、新しく始まった拠点事業をどのような形に充実発展させ、再生医科学研究所の発展に結び付けていくのか、研究所内外から意見、アイデアをいただき工夫していく必要があります。

平成 21 年度から 22 年度にかけて、人事面、組織面でいくつかの変化がありました。永田和宏教授が、平成 22 年 4 月から京都産業大学総合生命科学部の学部長として転出されることになりました。永田先生には再生医科学研究所の発足時から長年にわたり研究所の発展にご尽力いただきましたことに感謝申し上げます。組織面では、平成 22 年 4 月からは、iPS 細胞の臨床応用を目指して iPS 細胞研究所が発足し、山中伸弥教授が iPS 細胞研究所の専任教授として転出されます。iPS 細胞研究所、再生医科学研究所、医学部附属病院との緊密な連携のもとに iPS 細胞研究が発展し新たな成果が生まれることを期待します。

このような人事面、組織面の変化の機会に、再生医科学研究所の将来構想をあらためて練ることも必要かもしれません。再生医科学研究所は、「再生医学の学理の探究とその応用」を目標として、「幹細胞研究」、「再生医学基盤研究」、「医工学研究」、「臨床応用研究」を推進してきました。今後もこれらの主研究分野の充実を図るのは勿論ですが、同時に、研究所の英語名「Institute for Frontier Medical Sciences」にありますように、基礎医学生物学分野の優秀な人材を広く求め、再生医学・再生医療の新たな研究分野を開拓していくことが重要と思います。

再生医科学研究所に対して一層の御支援をお願い致します。

平成 22 年 1 月

所 長 坂 口 志 文

2. 京都大学再生医科学研究所概要

2-1 沿革

本研究所は、平成10年4月9日に設置された。その前身である胸部疾患研究所は、昭和16年3月に「結核の予防及び治療」を主軸とする結核研究所として設置され、昭和42年6月には結核胸部疾患研究所に名称変更、さらに昭和63年4月には「胸部疾患に関する学理及びその応用の研究」を目的とした胸部疾患研究所への全面改組が行われたが、胸部疾患に関する研究・治療を取り巻く社会的要請の変化から、胸部疾患研究所は57年間にわたる使命を終え、平成10年度より、同研究所基礎系分野及び臨床系分野の一部を人工臓器の研究・開発に関して顕著な業績を挙げて来た生体医療工学研究センターと統合し、さらに実地臨床医学を行う医学研究科との協力により、「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的とする再生医科学研究所に改組・転換された。

改組・転換に伴い、胸部疾患研究所の臨床系分野の一部と研究所附属病院は、大学院医学研究科・医学部並びに医学部附属病院へそれぞれ引き継がれた。

本研究所は、平成10年4月の発足時は5大研究部門と附属再生実験動物施設で組織された。その後平成14年4月に附属幹細胞医学研究センターが設置され、平成16年4月に研究部門の再編(1大研究部門減)の実施によりナノ再生医工学研究センターが設置された。平成16年10月には、住友電気工業(株)の寄附による寄附研究部門が4年間の時限で設置された。現在4大研究部門(生体機能学、生体組織工学、再生統御学、再生医学応用)、3附属施設となっている。平成17年10月には、工学研究科、医学研究科とともに、ナノメディシン融合教育ユニットに参加した。

本研究所は生命科学、医学、工学などの研究所が結集して再生医学の学際的基礎研究を推し進め、その成果の医学応用をめざすとともに、ヒトES細胞株の国内唯一の樹立機関として、樹立・特性解析を行ったES細胞を、全国の研究機関へ分配するナショナルバイオリソース事業を実施している。

また、平成20年10月には共同利用・共同研究拠点の認定を文部科学大臣より受け、再生医学・再生医療に関する共同研究を実施している。

主な建物は、再生医科学研究所西館(旧胸部疾患研究所附属病院の後身である医学部附属病院南西病棟と合同使用)、再生医科学研究所東館(旧生体医療工学研究センター)、ES細胞研究棟(平成14年竣工)、南部総合研究実験棟(ウイルス研、医学研究科との3部局合同使用)(平成14年竣工)の4棟となっている。

2-2 教員数等

(1) 教 員 (平成22年1月1日現在)

現 員	教 授	准教授	講 師	助 教	小 計	特任講師	特任助教	合 計
	11(3)	12(1)	2	9	34(4)	1	6	41(4)

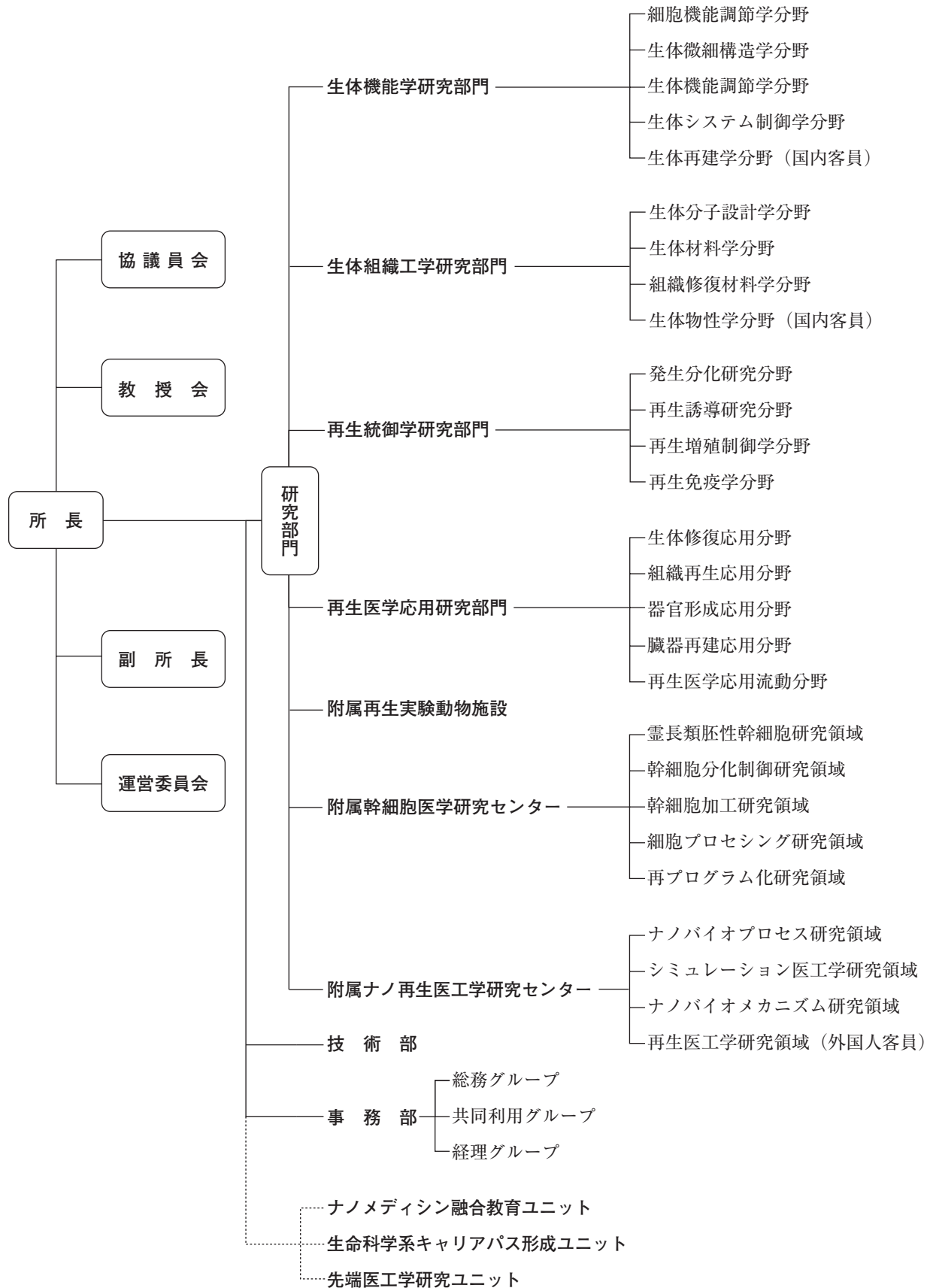
() 内は客員で外数

(2) 大学院生・研修員・研究生等 (平成22年1月1日現在)

大 学 院 生	研 修 員	研 究 生	外国人共同研究者等
124	9	10	4

2-3 組織図

(平成22年1月1日現在)



3. 研究概要と研究業績

生体機能学研究部門

細胞機能調節学分野

Department of Molecular and Cellular Biology

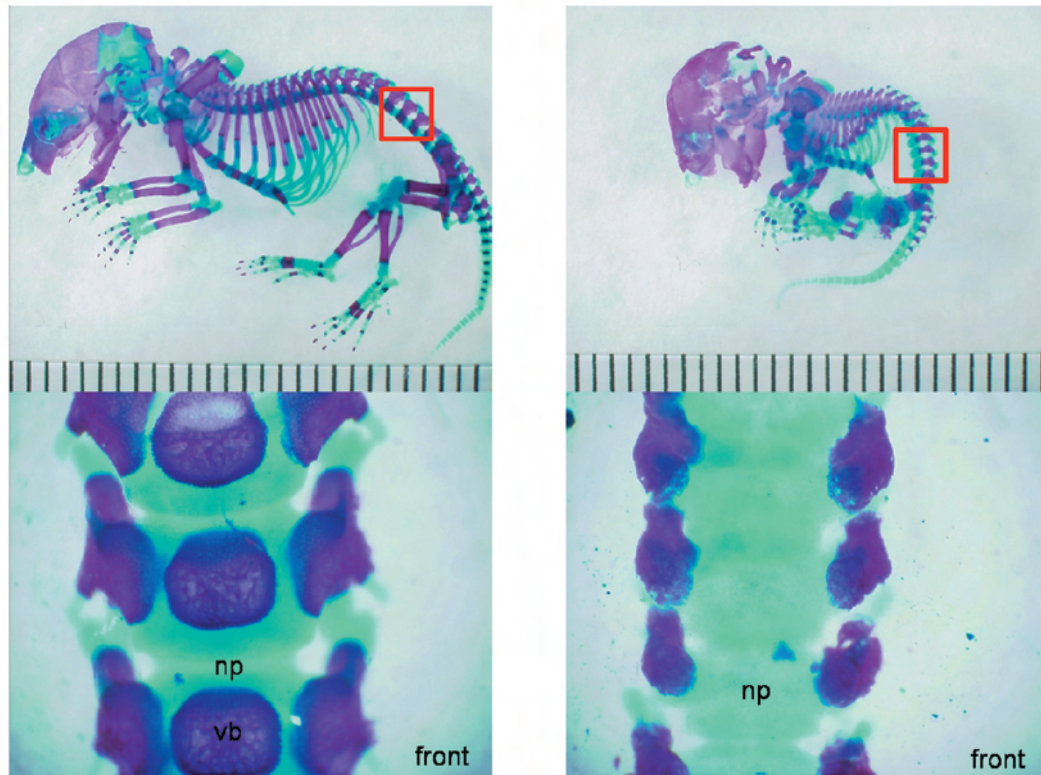
分野主任 教授 永田 和宏

Prof. Kazuhiro Nagata

【研究概要】

細胞機能調節学分野では、分子シャペロンの機能解析を中心に、再生現象の分子基盤とも言うべきタンパク質の合成・再生・品質管理の機構について、以下の3つの大きなテーマに添って研究を進めている。

第1のテーマは、小胞体における productive folding に関する研究であり、コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能解析を中心に研究を進めている。HSP47 はコラーゲンの正常な合成・分泌にとって必須の分子シャペロンであることを明らかにしてきたが、HSP47 は組織の繊維化にとっても重要な寄与をし、HSP47 の発現を抑



Hsp47-LoxP マウスを作製し、typeII collagen promoter 下に Cre 遺伝子を持つ ColII-Cre マウスと交配することにより、軟骨特異的に Hsp47 を欠損するマウスを作製した。マウスは出生直後に致死となり、軟骨、骨の形成に重篤な異常を呈した。左：対照，正常マウス，生後1日目。右：Hsp47 欠損マウス，生後一日目。軟骨が青色に，骨が紫色に染色されている。

制することによって繊維化の進行を遅らせることができる。HSP47 ノックアウトマウス、および HSP47 ノックアウト ES 細胞や繊維芽細胞を用いた研究より、HSP47 が I 型及び IV 型コラーゲンの分子成熟(3 本鎖形成)に必須の分子シャペロンであることを明らかにし、基底膜やコラーゲン繊維の形成に必須であることを明らかにした。また HSP47 ノックアウト細胞においては未熟なコラーゲンが小胞体に凝集体として蓄積するが、これらのコラーゲンはオートファジーによって分解を受けることを明らかにした。コラーゲン遺伝子は正常であっても、その高次構造成に必須の分子シャペロン欠損によって生じる異常コラーゲンの分解を示した訳だが、さらにコラーゲン遺伝子の突然変異による病態においても、凝集体を作るコラーゲンはオートファジーで分解されることも示すことができた。従来コラーゲンの遺伝病として知られる骨形成不全症における変異コラーゲンは小胞体関連分解によって分解されると考えられていたが、凝集をつくるような変異コラーゲンはオートファジー分解を受けることを示したもので、コラーゲン関連疾患の治療戦略を考える上でも重要な発見である。最近ではコンディショナルノックアウトを行うために、LoxP-Hsp47 を導入したマウスに、II 型コラーゲンのプロモーター下に Cre 遺伝子を発現するマウスを掛け合わせ、軟骨特異的に Hsp47 をノックアウトすることに成功した。このマウスでは II 型コラーゲンの分子成熟が阻害され、軟骨形成、および骨形成に顕著な異常が観察された。Hsp47 はおそらくほとんどの型のコラーゲンに対して分子シャペロンとして機能しているのであろうと考えている。(文責・永田)

第 2 のテーマとして、小胞体品質管理(ERQC)、小胞体関連分解(ERAD)の作用機序の解明を、細胞、分子ならびに個体レベルで行っている。遺伝子レベルで変異をもったタンパク質が ERAD 機構によって分解されたり、あるいは ERQC の破綻が疾患を引き起こすことが明らかにされ、病態解明や疾病治療の面からも注目されている。小胞体で生合成されるタンパク質の多くは N 結合型糖鎖をもった糖タンパク質であり、従って小胞体品質管理において、糖鎖のトリミングと、特定の構造をもった糖鎖を認識するレクチンが、タンパク質のフォールディングや分解を制御することが知られている。最近私たちは、哺乳類小胞体に存在する 2 つの新規レクチン OS-9 と XTP3-B をクローニングして機能解析を進めている。その結果、OS-9 が認識する糖鎖構造を決定し、さらに細胞内で EDEM3 がこの糖鎖のプロセッシングを担っている可能性を示すことができた。引き続き、もう 1 つのレクチン XTP3-B の糖鎖認識能の解析を行うとともに、これらの新規レクチンと、小胞体膜上に存在するユビキチンリガー複合体との相互作用・機能的関連の解明や、EDEM ファミリータンパク質の機能解析についても研究を進めている。(文責・細川)

第 3 のテーマとして、小胞体レドックス関連因子によるタンパク質の品質管理機構について研究を進めている。これまでジスルフィド還元酵素 ERdj5 がミスフォールドタンパク質の分子間ジスルフィド結合を還元することでこれらの凝集体形成を抑制し、小胞体関連分解(ERAD)を促進することを明らかにしてきた。ERdj5 はレクチン様分子 EDEM および分子シャペロン BiP と相互作用し、ERAD を促進する。ERdj5 のドメイン解析を行うことで ERdj5 は C 末端の thioredoxin 様ドメインで EDEM と結合し、ミスフォールドタンパク質を受け取り、これらのドメインにより基質を還元し、N 末端に位置する J ドメインを介して基質を BiP に受け渡すことで ERAD を促進していることを明らかにした。また、小胞体に約 20 種類存在するレドックス関連因子間のカスケードを明らかにするため、それぞれの因子が相互作用するパートナーを質量分析により網羅的に同定した。その結果に基づき、小胞体における酸化酵素 Ero1L と酸化異性化酵素 PDI が複合体を形成することで他のレドックス因子を効率良く酸化できることを明らかにした。これらのレドックス因子の 1 つであり、小胞体膜に局在する TMX4 が新生糖タンパク質のフォールディングを担う複合体の構成因子であるレクチン様分子シャペロン、カルネキシン及び酸化異性

化酵素 ERp57 との相互作用を明らかにした。

(文責・寶関)

The major focus in the Department of Molecular and Cellular Biology is to study the stress response and the regulation and function of molecular chaperone/stress proteins. We are working mainly on the three topics in this field.

We found and cloned the gene of a stress protein HSP47 which resides in the endoplasmic reticulum (ER) acting as a collagen-specific molecular chaperone in the pathway of collagen biosynthesis, processing and secretion. HSP47 specifically and transiently binds to various types of collagen in the ER. In addition to the binding specificity to collagen, the expression of HSP47 is always closely correlated with those of collagens during the normal development of mouse embryo as well as in the pathophysiological conditions including liver and renal fibrosis.

We already succeeded in making knockout mice lacking *hsp47* gene, which resulted in causing the embryonic lethality at 10.5 dpc in *hsp47*^{-/-} homozygotic mice. In these homozygotic mice, the maturation of type I collagen was abnormal and the immature form of procollagen accumulated in the tissues. Using *hsp47*^{-/-} ES cells, we found that type IV collagen secreted from *hsp47*-null cells could not form correct triple helices and the basement membrane was not formed in the embryoid bodies from those cells. We also observed the impairment of basement membrane formation in mouse embryos, thus these findings reveal that the knockout of a chaperone protein HSP47 causes the abnormality in molecular maturation of its substrate, and HSP47 is essential for mouse normal development. In those knockout mice, type IV collagen was observed to accumulate in the ER causing an ER stress, and apoptosis was also observed in those embryos after 10.5 dpc. Those procollagens accumulated in the ER of the Hsp47 knockout cells were eliminated by autophagy, not by ER-associated degradation.

We also established conditional knockout mice with LoxP-Hsp47 gene and after crossing the mice with Cre gene under type II collagen-promoter, we observed the mice with severe cartilage and bone formation with abnormal molecular maturation of type II collagen.

(By K. Nagata)

Another project we are working on is the molecular mechanism of ERQC (ER quality control) and ERAD (ER-associated degradation). Many works have clarified the importance of ERAD of misfolded proteins and the disruption of ERQC in genetic diseases and neurodegenerative disorders. Since most of the proteins synthesized in the ER are *N*-glycosylated, ERQC of glycoproteins are regulated by the processing of the *N*-glycans and the recognition of specific *N*-glycans by the lectins. Recently, we have cloned two mammalian ER lectins OS-9 and XTP3-B. We have clarified the oligosaccharide structures that OS-9 lectin domain recognizes, and have shown that EDEM3 is capable of presenting this glycan signal for degradation by processing specific mannoses *in vivo*. We are now analyzing the oligosaccharide structures that XTP3-B lectin domains identify. Furthermore, we are analyzing the association and function of these lectins with a membrane-embedded ubiquitin ligase complex HRD1-SEL1L. The functional analysis of mammalian EDEM family proteins are also in progress.

(By N. Hosokawa)

The other project we are working on is the molecular mechanism of protein quality control by oxidoreductases in the ER. We identified that an ER disulfide reductase, ERdj5 promotes ERAD by cleaving of intermolecular disulfide bonds of misfolded proteins and preventing their oligomer and aggregate formation. And also ERdj5 inter-

acts with EDEM, which recognizes misfolded proteins via their N-glycan portions, and a molecular chaperone, BiP for efficient ERAD. Recently, we have performed the domain analysis of ERdj5 and have found that EDEM interacts with ERdj5 via the C-terminal thioredoxin-like domain cluster and recruits misfolded glycoproteins to ERdj5 and then the C-terminal cluster of ERdj5 cleaves their intermolecular disulfide bonds. BiP associates with ERdj5 through the J-domain in the N-terminus, and captures the reduced misfolded proteins until they are transferred to the dislocation channel. Also, we have identified interaction partners among about 20 ER oxidoreductases by co-immunoprecipitation and followed by LC/MS analysis to elucidate redox cascades in the ER. Based on the analysis, we have found that the redox complex composed of an ER oxidase, Ero1L and an ER oxidoreductase, PDI oxidize other ER oxidoreductases efficiently. We have also found that an ER oxidoreductase, TMX4, which is localized on the ER membrane, interacts with a lectin-like chaperone, calnexin and an ER oxidoreductase, ERp57, both of which are involved in the glycoprotein folding complex. (By J. Hoseki)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- N. Hosokawa, Y. Kamiya, D. Kamiya, K. Kato & K. Nagata : Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed *N*-Glycans. *J. Biol. Chem.* **284**(25) : 17061-17068 (2009)
- N. Hosokawa, L.O. Tremblay, B. Sleno, Y. Kamiya, I. Wada, K. Nagata, K. Kato & A. Herscovics : EDEM1 accelerates the trimming of α 1, 2-linked mannose on the C branch of *N*-glycans. *Glycobiology* in press
- J. Hoseki, H. Sasakawa, Y. Yamaguchi, M. Maeda, H. Kubota, K. Kato & K. Nagata : Solution structure and dynamics of mouse ARMET. *FEBS. Letters.* in press
- Y. Ishida, A. Yamamoto, A. Kitamura, S. R. Lamande, T. Yoshimori, F. B. John, H. Kubota & K. Nagata : Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. *Mol. Biol. Cell.* **20** : 2744-2754 (2009)
- Y. Ishida & Kazuhiro Nagata : Autophagy eliminates a specific species of misfolded procollagen and plays a protective role in cell survival against ER stress. *Autophagy* in press
- Y. Sugiura, K. Araki, S. Iemura, T. Natsume, J. Hoseki & K. Nagata : The novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *J. Biol. Chem.* in press
- Y. Ishikawa, J. Wirz, J. A. Vranka, K. Nagata & H. P. Bächinger : Biochemical Characterization of the Prolyl 3-Hydroxylase 1-Cartilage-associated Protein-Cyclophilin B Complex. *J. Biol. Chem.* **284**(26) : 17641-17647 (2009)
- M. Ikeda, M. Naitoh, H. Kubota, T. Ishiko, K. Yoshikawa, S. Yamawaki, M. Kurokawa, A. Utani, T. Nakamura, K. Nagata & S. Suzuki : Elastic fiber assembly is disrupted by excessive accumulation of chondroitin sulfate in the human dermal fibrotic disease, keloid. *Biochem Biophys Res Commun.* **390** : 1221-1228 (2009)
- Y. Honzawa, H. Nakase, Y. Takeda, K. Nagata & T. Chiba : Heat shock protein 47 can be a new target molecule for intestinal fibrosis related to inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* in press

2) 著書および総説

永田和宏, 塩田浩平(編): 医学のための細胞生物学, 南山堂(2009)

永田和宏, 竹縄忠臣, 田代 啓, 野田 亮, 森 正敬, 八杉貞雄(訳): 医学細胞生物学 東京化学同人(2009)

N. Hosokawa & K. Nagata: M-type lectins as novel components of secretory pathways. "ANIMAL LECTINS A Functional View" (Eds Gerardo R. Vasta, Hafiz Ahmed) CRC Press pp. 165-169 (2009)

N. Hosokawa, Y. Kamiya & K. Kato: The role of MRH domain-containing lectins in ERAD. *Glycobiology* in press

Jun Hoseki, Ryo Ushioda & Kazuhiro Nagata: Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Biochem.* in press

石田義人, 永田和宏: 細胞外マトリックス産生. 遺伝子医学 MOOK 別冊「ますます重要になる細胞周辺環境の科学技術」メディカルドゥ pp211-215(2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

細川暢子, 和田郁夫, 神谷由紀子, 加藤晃一, 永田和宏: 小胞体レクチンによる糖タンパク質の品質管理機構. 第61回日本細胞生物学会大会, 名古屋市, 2009.06.02-04

寶関 淳, 永田和宏: Reductive source for the ERAD enhancing disulfide reductase, ERdj5. 第82回日本生化学会大会, 神戸市, 2009.10.21-24

潮田 亮, 寶関 淳, 永田和宏: ERdj5 を介した小胞体関連分解の分子機序の解明. 第9回日本蛋白質科学会年会, 熊本市, 2009.05.20-22

潮田 亮, 寶関 淳, 永田和宏: ERdj5 を介した小胞体関連分解の分子機序. 第61回日本細胞生物学会大会, 名古屋市, 2009.06.02-04(口頭発表およびポスター)

潮田 亮, 寶関 淳, 永田和宏: ERdj5 への基質リクルート機構の解明. 第82回日本生化学会大会, 神戸市, 2009.10.21-24(口頭発表およびポスター)

潮田 亮, 寶関 淳, 永田和宏: 還元酵素 ERdj5 を介した小胞体関連分解. 京都大学再生医科学研究所学術講演会, 京都市, 2009.12.14

石田義人: 小胞体に蓄積する異常コラーゲンの分解. 京都大学再生医科学研究所若手発表会, 京都市, 2009.01.16
Yoshihito Ishida, Akitsugu Yamamoto, Akira Kitamura, Shireen R Lamande, Tamotsu Yoshimori, John F Bateman, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata: Autophagy eliminates misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum for cell survival. Yokosuka Science Festa 2009 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Shonan, 2009.06.05

新木和孝, 家村俊一郎, 夏目 徹, 永田和宏: 小胞体レドックスタンパク質ネットワーク解析. 第61回日本細胞生物学会大会, 名古屋市, 2009.06.02-04

真砂有作, 河野章悟, 那須 輝, 青山朋樹, 戸口田淳也, 藤田克昌, 近藤 玄, 永田和宏: 軟骨細胞において HSP47 を欠損したマウスはヒト軟骨無発生症様の表現型を示す. 日本薬学会第129年会, 京都市, 2009.03.26

真砂有作: 軟骨細胞において HSP47 を欠損すると重篤な軟骨形成・内軟骨性骨化異常を示す. 第27回日本骨代謝学会学術集会, 大阪市, 2009.07.23(口頭発表)

Yusaku Masago, Shogo Kawano, Akira Nasu, Tomoki Aoyama, Junya Toguchida, Katsumasa Fujita, Gen Kondoh,

Kazuhiro Nagata : HSP47 has essential roles in the cartilage rofamation and endochondral ossification.The 36th Congress of thr International Union of Physiological Sciences, Kyoto, 2009.07.31

真砂有作, 細矢明宏, 河野章悟, 那須 輝, 戸口田淳也, 藤田克昌, 小澤英浩, 近藤 玄, 永田和宏: コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 は軟骨形成に重要である. 京都大学再生医科学研究所学術講演会, 京都市, 2009.12.14

萩原誠智, 寶関 淳, 新木和孝, 潮田 亮, 永田和宏: 小胞体関連分解を担う還元酵素 ERdj5 のドメイン解析. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 名古屋市, 2009.06.02-04(口頭発表およびポスター)

杉浦仁美, 新木和孝, 寶関 淳, 永田和宏: チオレドキシシン様ドメインを持つ小胞体膜タンパク質 TMX4 は酸化還元酵素として機能する. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 名古屋市, 2009.06.02-04

飯田恭崇, 細川暢子, 永田和宏: 小胞体関連分解に関わる HRD1-SEL1L 複合体の安定性と機能. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸市, 2009.10.21-24

Asami Oguro-Ando, Hiroshi Kubota, Yoriko Atomi, Shoichi Ishiura, Kazuhiro Nagata: Gravity-responsive transcriptional regulation of collagen-specific molecular chaperone HSP47. 日本宇宙生物科学会第 23 回大会 2009.10.2 つくば市(口頭発表)

本間貴之, 石川善弘, Mohd Firdaus Abdul Wahab, 真砂有作, 松岡泰弘, Andrew D.Miller, 久保田広志, 永田和宏: コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 のコラーゲン相互作用領域解析. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸市, 2009.10.21-24(口頭発表およびポスター)

北村 朗, 稲田のりこ, 久保田広志, 松本 弦, Richard I Morimoto, 金城政孝, 永田和宏: 脱凝集過程におけるタンパク質分解経路と細胞毒性の関係について. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2009.12.09-12(口頭発表およびポスター)

Yuki Sugimoto, Yusaku Masago, Yuji Hiraki, Kazuhiro Nagata, Chisa Shukuami: Generation of Conditional Knock-out mice lacking HSP47 in the tendon cell lineage. Global COE「生命原理の解明を基とする医学研究教育拠点」International Symposium / Retreat 2009, 淡路島, 2009.11.06-08

杉本由紀, 真砂有作, 永田和宏, 開 祐司, 宿南知佐: 運動器の連結システムにおけるコラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の役割. 京都大学再生医科学研究所学術講演会, 京都市, 2009.12.14

2) 招待講演・シンポジウム

Kazuhiro Nagata, Ryo Ushioda, Kazutaka Araki, Jun Hoseki: Distnct pathways for degradation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum. 第 4 回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 吹田市, 2009.02.01

永田和宏: 波乱に満ちたタンパク質の一生ータンパク質品質管理機構とその破綻による病気ー. 第 54 回食と健康を考える会, 東京都, 2009.03.09

永田和宏: 細胞におけるタンパク質の品質管理. 第 23 回カフェ・デ・サイエンス, 東京都, 2009.03.23

Kazuhiro Nagata: Revisiting of collagen-specific molecular chaperone Hsp47: Fate of procollagen with or without Hsp47. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium. Opening Lecture, Shonan, 2009.06.04

永田和宏: 小胞体におけるレドックス制御と品質管理. 秋田大学工学資源学部分子生物学特別講演, 秋田市, 2009.07.21

Kazuhiro Nagata: Quality control of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum. 21th IUBMB International Congress and 12th FAOBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai (China), 2009.08.05

Kazuhiro Nagata: Control of newly synthesized proteins in the ER. The 5th International Symposium on Autophagy: Molecular mechanism, cellular and physiological functions, and diseases. Plenary Lecture, Otsu, 2009.09.24

永田和宏: 小胞体関連分解の2つの経路. 第4回小胞体ストレス研究会特別講演, 生駒市, 2009.09.25

永田和宏: 私の転機. 科学研究費補助金特定領域研究「タンパク質の社会」若手ワークショップ特別講演, 京都市, 2009.09.28

Kazuhiro Nagata: Two distinct ERAD pathways for misfolded glycoprotein and non-glycoprotein. 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. Plenary lecture, Sapporo, 2009.10.06

細川暢子: タンパク質の品質管理機構. UMN ファーマセミナー, 横浜市, 2009.04.02

細川暢子: タンパク質の品質管理機構. 京都府立医科大学大学院医学研究科・免疫・微生物学セミナー, 京都市, 2009.08.28

Nobuko Hosokawa: OS-9 and XTP3-B, the MRH Domain-containing Lectins in Mammals are Involved in ERAD. Annual Conference of the Society for Glycobiology, San Diego(USA), 2009.11.15

寶関 淳: 小胞体関連分解を担うジスルフィド還元酵素 ERdj5. 第4回 Skeletal Research Meeting, 京都市, 2009.11.21

Kazutaka Araki, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume and Kazuhiro Nagata: Interactome analysis ER redox proteins. 第82回日本生化学会大会シンポジウム, 神戸市, 2009.10.22

Akira Kitamura, Masataka Kinjo, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata: Dynamics of aggregation and disaggregation of neurodegenerative disease-causative proteins. International Conference Protein Folding and neurodegenerative disease, Kyoto, 2009.04.06

久保田広志, 北村 朗, 稲田のりこ, 松本 弦, Richard Morimoto, 金城政孝, 永田和宏: 筋委縮性硬化症をおこす SOD1 変異体の生細胞内における凝集および脱凝集過程の解析. 第61回日本細胞生物学会大会シンポジウム, 名古屋市, 2009.06.03

Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Hideaki Itoh, Masataka Kinjo & Kazuhiro Nagata: Fluorescently labeled proteins as a tool for analyzing the dynamics of protein quality control in living cells. The Sixth Conference on Materials Engineering for Resources. Keynote session 'New Materials for Life Science-1'. 秋田市. 2009.10.22

Kenji Inaba, Masatoshi Hagiwara, Ken-ichi Maegawa, Mamoru Suzuki, Ryo Ushioda, Jun Hoseki & Kazuhiro Nagata: Structure Basis of an ERAD pathway mediated by an ER-resident protein disulfide reductase, ERdj5. 第82回日本生化学会大会シンポジウム, 神戸市, 2009.10.21-24



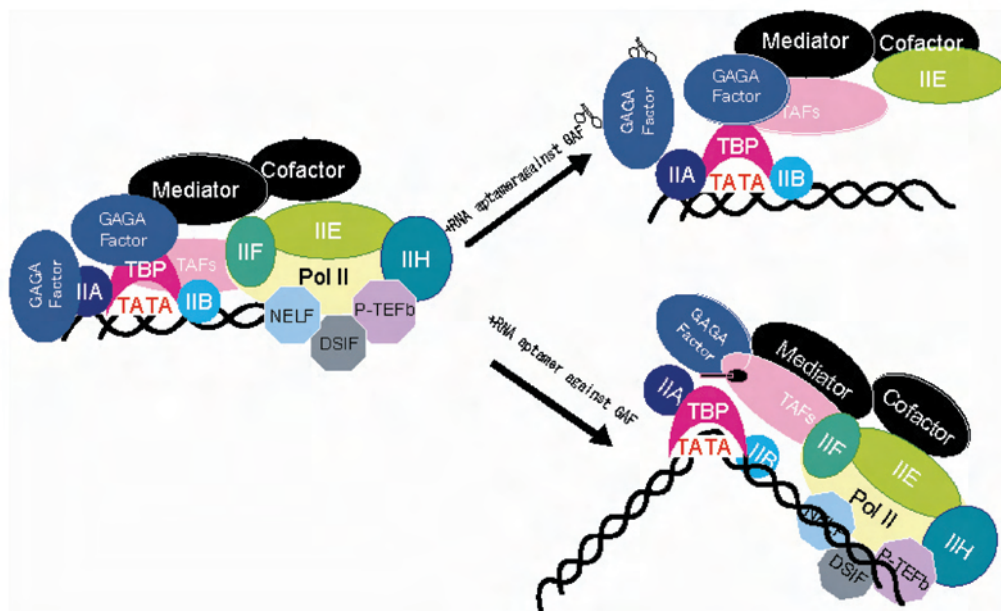
生体微細構造学分野 Department of Ultrastructural Research

講師 平芳 一法

Lect. Kazunori Hirayoshi

【研究概要】

DNA上に記憶された遺伝情報を正しく蛋白質に読みかえるために必要な転写は、発生、分化の運命の決定をはじめとして、生命現象の制御に関わっている。転写機構の解明を目指す研究は、鋳型であるDNAそのものに結合する因子を対象とした研究から、核中のDNAを含む構造体である染色体構造の制御機構も含めた研究に移行しつつある。染色体構造は、必要なときにのみ遺伝子が転写されるように、転写因子の結合からDNAを守るように機能している。つまり、染色体を介した制御も転写制御に深く関わっている。染色体の基本構造であるクロマチン構造の維持による遺伝子の不活化を乗り越え、転写可能な状態をつくるために、クロマチン構造を解きほぐす因子が必要である。ショウジョウバエでは、この過程に関与する因子として知られているのがGAGA因子である。転写制御領域に存在するGAGA配列に特異的に結合し、クロマチンリモデリングに必要な因子をリクルートすることが知られているが、転写の実体酵素であるRNA Polymerase IIに転写の開始から終了まで結合していることが報告されており、さらに広範な機能が予想され、転写の全体像を考える上でも重要な因子と考えられる。われわれはGAGA因子特異的なアプタマーを取得し、詳細な解析を行った。



aptamer 特異的な阻害効果

in vitro 転写から得られた結果を基に、GAGA 因子に対する特異的なアプタマーが転写複合体の中で機能している様子を模式的に示した。2種類のアプタマー(↑, ↓)はそれぞれ違う部位で機能し、GAGA 因子が転写の異なったステージで機能していることを明らかにした。

Aptamer specific inhibitory effect

Figure schematically shows inhibitory effect of each GAGA specific aptamers (↑, ↓) in the transcription complex. Two aptamers show their effect on the different locus and it clarify the different function of GAGA factor in the transcription.

GAGA 因子は、DNA への結合に重要な Zn ドメイン、他の因子あるいは自己の重合化に関与する POZ ドメイン、グルタミン酸残基に富み、重合化、試験管内での転写活性化に関与することが報告されている Q rich ドメインという3つの機能ドメインからなる。われわれの取得したアプタマーは POZ ドメインを中心とした領域に結合し、転写を阻害する。つまり、複数の因子によって形成される転写複合体中で、GAGA 因子を介した転写因子の結合を阻害することにより、転写を阻害するものと思われる。主要な基本転写因子である TBP (TATA binding protein) の結合に影響を与えることも明らかにし、この仮説を実証し、GAGA 因子が転写を推進するうえで、重要な働きをしていることを明らかにした。さらに興味深いことに、ショウジョウバエの発生やストレス応答などに関与する遺伝子の多くは、GAGA 因子依存的遺伝子として知られが、その依存性は、転写制御領域に存在する GAGA 因子のみでなく別の機構によっても決定されていることを明らかにした。今回の研究で、分子ピンセットとして生体内の蛋白質間の相互作用を解析するのに有効な方法であることを示したアプタマーの使用により、今後明らかにできることを考えている。

一連の実験に解析ツールとして使用した RNA aptamer は、近年注目されている抗体医薬に代わるものとして期待される。抗体と同様に特定分子に結合するが、その結合力はむしろ強く、生産性、細胞内での扱いに優れているなどの特徴から、医薬品としての応用が期待される。分子の修飾による特異性の増大など、応用に向けて種々の努力がなされているが、我々は、生体内で効率的に働く aptamer 分子の構築を試みている。多量体を作成することで、阻害剤としての効果が著しく増大することを明らかにした。生体内では一定時間で分解されるという特徴を生かし、必要なときにのみ働く、副作用の少ない薬剤となるよう、上述の方法を含め、その分子の有効な構築を試みている。

Chromosome structure is a big issue of the transcriptional regulation. The binding of the transcription factor is inhibited by the chromosome structure to prevent the improper transcription. To overcome this structure for starting the proper transcription, GAF has a central role in *Drosophila*. GAF (GAGA factor) is well known as a multifunctional factor. It has been reported that this factor involves a nucleosome remodeling at promoter region, formation of promoter proximal pausing of RNA polymerase II, and the transcription elongation. In addition, the characteristic glutamine rich domain of GAF has a potential to activate the transcription by stabilizing the PIC. GAF is also reported that moves with RNA polymerase II all way down to the 3' end of the gene. To analyze the role of GAF in the transcription complex precisely, we tried a new analytical approach with RNA aptamer as a molecular forceps. We obtained two kinds of aptamer which bind to GAF with a high affinity. These aptamers bound to the POZ domain of GAF, which is important for the protein-protein interaction, but not to the zinc finger and the glutamine rich domain, although aptamers weakly prevented the GAF from binding to the GAGA element. Interestingly, these aptamers inhibited the *in vitro* transcription on the naked DNA template. One aptamer showed the inhibitory effects on the transcription from the promoters containing GAGA elements when adding the aptamer before the transcription initiation. The other showed the inhibitions after the transcription initiation. The effect of this aptamer was independent of whether the presence or absence of the GAGA element at the promoter region. However this effect was observed only on the transcription from the GAF-dependent promoter, not from the GAF-independent promoter. These results suggest the functions of GAF in initiation, elongation or re-initiation steps via the interaction with other factors in the transcription apparatus, which imply the importance of GAF as a regulator throughout the whole process of transcription

RNA aptamer is expected as a substituent of antibody therapy. To expand the application of RNA aptamer as a cure drug or examination reagent, we tried to establish the construct protocol for more effective aptamers.

【業績目録】

◆ 学会等の発表 ◆

学会発表

法邑賢一・平芳一法：RNA アプタマーを用いた転写因子 GAF の機能解析. 第 82 回日本生化学会大会 (2009.10.21-24. 神戸)

法邑賢一・平芳一法：PIC 形成過程における TBP/GAF 間相互作用の役割. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.9-12. 横浜)

生体機能調節学分野 Department of Experimental Pathology

分野主任 教授 坂口 志文

Prof. Shimon Sakaguchi

【研究概要】

(1) 免疫寛容の基礎的研究

正常な免疫系は、非自己抗原に対して免疫応答を示すが、正常自己構成成分に対しては反応しない。また、アレルギーに見られる過剰な免疫応答を阻止する機構を有している。このような免疫自己寛容、免疫恒常性維持の基礎的メカニズムとして、制御性 T 細胞による抑制的制御が重要である。その機能異常は自己免疫病、アレルギーの原因となる。制御性 T 細胞の免疫学的特徴のひとつは、転写因子 Foxp3 を特異的に発現し、正常 T 細胞に Foxp3 を異所性に発現させれば制御性 T 細胞に機能転換できることである。即ち、Foxp3 は、制御性 T 細胞の発生・分化のマスター制御遺伝子である。Foxp3 遺伝子プロモーター下に Cre 分子を発現させたノックインマウス、Runx1, Runx3, また、すべての Runx の co-factor である Core binding factor- β (Cbf- β) 遺伝子に loxP を挿入したマウス系統を確立し、両者を掛け合わせることで、制御性 T 細胞特異的に Runx 分子を条件的に欠損させたマウスを作製した。このような制御性 T 細胞特異的 Cbf- β あるいは Runx1 欠損マウスは、制御性 T 細胞全体を欠損させたマウスと酷似した様々な自己免疫病、高免疫グロブリン E 血症を高率に発症した。試験管内での抑制活性も顕著に低下していた。さらに、Cbf- β あるいは Runx1 の欠損によって Foxp3 の発現強度が減少していた。この結果は、Runx1 が Foxp3 の機能発現に必須であることを意味し、制御性 T 細胞の機能操作の分子標的となり得ることを意味する。

(2) ヒト制御性 T 細胞の解析

ヒトの Foxp3⁺T 細胞は、制御性 T 細胞のみならずエフェクター機能をもつ T 細胞を含む。如何にヒト制御性 T 細胞を機能的なサブセットに弁別するかに関して従来議論があった。今年度、ヒト Foxp3⁺T 細胞を Foxp3 および CD45RA 分子の発現程度によって、3 つのサブセットに分類できることを示し、この分類の有効性を検討した。即ち、Foxp3-lowCD45-high の休止期制御性 T 細胞 (resting Treg)、Foxp3-high CD45RA-low のエフェクター制御性 T 細胞 (effector Treg)、および Foxp3-lowCD45RA-low の非制御性 T 細胞である。抗原刺激により、resting Treg は、effector Treg に分化、増殖し、抑制活性を発揮した後、大部分はアポトーシスによって死んでいく。この分類によって、サルコイドーシス、SLE などの免疫疾患では、それぞれに特徴的なサブセットの比率の変化が見られた。さらに、自己免疫病の治療、移植免疫における臓器拒絶の抑制に制御性 T 細胞を応用する場合、resting Treg の増殖を図ることが重要であり、腫瘍免疫、微生物免疫で制御性 T 細胞機能を下げ免疫応答を亢進させるためには effector Treg を標的としてその減少を図ることが重要であると考えられた。

(3) 新しい動物モデルを用いた関節リウマチの原因・発症機構の研究

免疫病理学的にヒトの関節リウマチと酷似する慢性関節炎を自然発症するマウスモデル (SKG マウス) を確立し、その原因・発症機構を解析している。この自己免疫性関節炎は、IL-17 を産生する CD4 ヘルパー T 細胞である Th-17 細胞によって媒介される。本年度、Th-17 細胞の活性化に補体の活性化が重要であることを実験的に証明した。例えば、補体のレクチン経路は活性化する mannan を投与すると SKG マウスに関節炎を惹起できた。その分子機構として、補体の分解産物である C5a が、マクロファージを強力に活性化し、IL-6 の産生を促し、組織由来の TGF- β と IL-6 が関節炎惹起能をもつ T 細胞を Th-17 細胞に分化・増殖させると考えられた。この関節炎発症機構を、C5a レセプター欠損マウスを用いて証明した。この結果は、補体が関節炎治療・予防の分子標的となり得ることを意味する。

This department studies : (i) the role of regulatory T cells (Tregs) for the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis ; (ii) how human Treg cells develop and control immune responses in autoimmunity, allergy, tumor immunity and organ transplantation ; and (iii) the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis by analyzing a mouse model of autoimmune arthritis.

One aspect of immunologic self-tolerance (i.e., immunological unresponsiveness of the normal immune system of normal self-constituents) is actively maintained via a T cell-mediated dominant control of self-reactive T cells by naturally occurring regulatory CD4⁺ Tregs. We previously showed that the transcription factor Foxp3 is a master regulator of their development and function.

This year we have attempted to understand the molecular basis of the function of Foxp3, in particular, how another transcription factor Runx contributes to the function of Foxp3. We have established conditional knockout (KO) mice in which Cre was expressed under the Foxp3 promoter and the gene encoding Runx1, Runx3, or Cbf- β , a cofactor for all Runx proteins, was floxed. The Treg-specific Cbf- β or Runx1, but not Runx3, conditional KO mice spontaneously developed autoimmune diseases and hyper-globulinemia E, suggesting that they are prone to develop not only autoimmune disease but also allergy. Cbf- β - or Runx1-deficient Tregs also showed impaired suppressive function *in vitro*. These results collectively indicate that Runx1 plays a crucial role in Foxp3⁺ Treg-mediated immune suppression.

We have also made attempts to characterize human Foxp3⁺ T cells, which appear to contain not only Treg cells but also non-Treg cells. We have shown that the expression levels of Foxp3 and CD45RA can dissect Foxp3⁺ T cells into three populations. That is, Foxp3-low CD45RA-high resting or naive Treg cells, Foxp3-high CD45RA-low effector Treg cells, and Foxp3-low CD45RA-low non-Treg cells. Upon antigenic stimulation, naive Treg cells up-regulate Foxp3 and proliferate, differentiating into the effector Treg population that exerts strong suppressive activity and, after suppression, dies by apoptosis. This classification of Treg subsets is useful to assess pathophysiological states of immunological diseases, for example, sarcoidosis and SLE. Further it is used to induce antigen-specific Treg cells from enriched naive Treg cells to induce transplantation tolerance or treat autoimmune disease, and conversely to deplete effector Treg cells to enhance immune responses for provoking tumor or microbial immunity.

We are also investigating the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis (RA) by analyzing a mouse model (called SKG mice) established in our laboratory. SKG mice, which have a mutation of the gene encoding ZAP-70, a T cell-specific signaling molecule, spontaneously develop autoimmune arthritis chiefly mediated by IL-17-secreting CD4⁺ T cells (Th-17 cells). This year, we have analyzed the contribution of serum complement to drive the differentiation and expansion of self-reactive T cells to pathogenic Th-17 cells. For example, mannan, a prototypic activator of the lectin pathway of complement activation cascade, evoked arthritis in SKG mice. C5a, a product of all the complement activation pathways, activate macrophage to secrete IL-6, which together with tissue TGF- β drives antigen-reactive T cells to Th-17 effector T cells mediating autoimmune arthritis. These findings indicate that serum complement can be a key molecular target in preventing and treating autoimmune arthritis like RA.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Wing, K., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self-tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 11 : 7-13, 2010.
- Ohkura, N., and Sakaguchi, S. A novel modifier of regulatory T cells *Nat. Immunol.* 10 : 685-686, 2009.
- Miyara, M., Shima, T., Kitoh, A., Yoshioka, Y., Niwa, A., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi T., Nomura, T., Wing, K., Ono, M., Amoura, Z., Guy Gorochoy, G., and Sakaguchi, S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4(+) T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 30 : 899-911, 2009.
- Kitoh, A., Ono, M., Naoe, Y., Ohkura, N., Yamaguchi, T., Yaguchi, H., Kitabayashi, I., Tsukada, T., Nomura, T., Miyachi, Y., Taniuchi, I., and Sakaguchi, S. Indispensable role of Runx1/Cbfb complexes for *in vivo* suppressive function of FoxP3⁺ regulatory T cells. *Immunity.* 31 : 609-620, 2009.
- Nagahama, K., Fehervari, Z., Oida, T., Ogawa, O., and Sakaguchi, S. Differential control of alloantigen-specific regulatory T cells and effector T cells by anti-CD4 and other agents in establishing transplantation tolerance. *Int. Immunol.* 21 : 379-391, 2009.

- Miyara, M., Wing, K., and Sakaguchi, S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3⁺ regulatory T-cell activation and expansion. *J Allergy Clin Immunol.* 123 : 749-55, 2009.
- Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., and Yamaguchi, T. Regulatory T cells : how do they suppress immune responses? *Int. Immunol.* 21 : 1105-11, 2009.
- Sakaguchi, S., Wing, K., and Yamaguchi, T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur. J. Immunol.* 39(9): 2331-6, 2009.
- Okamura, T., Fujio, K., Shibuya, M., Sumitomo, S., Shoda, H., Sakaguchi, S., and Yamamoto, K. CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106 : 13974-9, 2009.
- Ito, Y., Usui, T., Kobayashi, S., Iguchi-Hashimoto, M., Ito, H., Yoshitomi, H., Nakamura, T., Shimizu, M., Kawabata, D., Yukawa, N., Hashimoto, M., Sakaguchi, N., Sakaguchi, S., Yoshifuji, H., Nojima, T., Ohmura, K., Fujii, T., and Mimori, T. Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60 : 2294-2303, 2009.
- Piao J, Kamimura Y, Iwai H, Cao Y, Kikuchi K, Hashiguchi M, Masunaga T, Jiang H, Tamura K, Sakaguchi S, Azuma M. Enhancement of T-cell-mediated anti-tumour immunity via the ectopically expressed glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related receptor ligand (GITRL) on tumours. *Immunology.* 127 : 489-99, 2009.
- Onodera, T., Jang, M. H., Guo Z, Yamasaki, M., Hirata, T., Bai, Z., Tsuji, N. M., Nagakubo, D., Yoshie, O., Sakaguchi, S., Takikawa, O., and Miyasaka, M. Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes : functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. *J. Immunol.* 183 : 5608-5614, 2009.
- Liu, Z., Tian, S., Falo, L. D. Jr, Sakaguchi, S., and You Z. Therapeutic Immunity by Adoptive Tumor-primed CD4(+) T-cell Transfer in Combination With In Vivo GITR Ligation. *Mol. Ther.* 17 : 1274-81, 2009.
- Duan, F., Lin, Y., Liu, C., Engelhorn, M. E., Cohen, A. D., Curran, M., Sakaguchi, S., Merghoub, T., Terzulli, S., Wolchok, J. D., and Houghton, A. N. Immune rejection of mouse tumors expressing mutated self. *Cancer Res.* 69 : 3545-3553, 2009.
- Yoshitomi, M., Koshiba, T., Haga, H., Li, Y., Zhao, X., Cheng, D., Miyagawa, A., Sakashita, H., Tsuruyama T., Ueda, M., Wood, K., Sakaguchi S., Manabe, T., Tanaka, K., and Uemoto, S. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following liver transplantation. *Transplantation.* 87 : 606-614, 2009.

2) 総 説

- 山口智之, 坂口志文 : 制御性 T 細胞の作用における CTLA-4 の役割 臨床免疫・アレルギー科 Vol.51 No.4 2009 (428-434)
- 山口智之, 坂口志文 : 感染症における CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞 蛋白質 核酸酵素 Vol.54 No.8 2009(1076-1081)
- 山口智之, 坂口志文 : 制御性 T 細胞とアレルギー疾患 アレルギー疾患の免疫機構 実験医学 Vol.27 No.20 2009 (3239-3245)
- 小野昌弘 : 制御性 T 細胞による免疫制御機構 アレルギー・免疫 Vol.16 No.5 2009(628-633)

李 穎, 坂口志文, 上本伸二, 小柴貴明: 臓器移植免疫寛容における制御性 T 細胞 アレルギー・免疫 Vol.16 No.5
2009(700-706)

◆ 学会等の講演 ◆

1) 学会・研究会発表

Tomoyuki Yamaguchi: Construction of regulatory T cells without Foxp3 Kyoto-University Global COE Center for Frontier Medicine International Symposium/Retreat 2009(2009.11.6-8 淡路島)

橋本 求, 廣田圭司, 吉富啓之, 前田伸治, 寺平晋, 秋月修治, Prieto-Martin Paz, 野村尚史, 坂口教子, 高橋 実, 藤田貞三, 三森経世, 坂口志文: 補体による Th-17 依存性自己免疫性関節炎の制御 第 39 回日本免疫学会総会学術集会(2009.12.2-4 大阪)

吉岡弓子, 小野昌弘, 小西郁生, 坂口志文: Control of T cell differentiation and cytokine production by an axis made by a set of morphogens 第 39 回日本免疫学会総会学術集会(2009.12.2-4 大阪)

坂口志文, 宮良 亮: Functional delineation and differentiation dynamics of FoxP3-expressing subpopulation of human CD4+ T cells 第 39 回日本免疫学会総会学術集会(2009.12.2-4 大阪)

山口智之, 坂口志文: IL-2 低産生 CTLA-4 高発現の活性化 T 細胞は免疫抑制活性を持つ 第 39 回日本免疫学会総会学術集会(2009.12.2-4 大阪)

秋月修治, 坂口教子, 藤森千尋, 前田伸治, 伊藤能永, 橋本 求, 野村尚史, 斎藤 隆, 三森経世, 坂口志文: TCR シグナル不全による制御性 T 細胞異常と自己免疫病の発症 第 39 回日本免疫学会総会学術集会(2009.12.2-4 大阪)

前田伸治, 田中 聡, 廣田圭司, 藤森千尋, 野村尚史, 秋月修治, 橋本 求, 伊藤能永, 坂口教子, 坂口志文: 正常 ZAP-70 の発現量操作による自己免疫性関節炎の誘導 第 39 回日本免疫学会総会学術集会(2009.12.2-4 大阪)

2) 講演・シンポジウム

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 JOINT FORUM(2009.1.7-8 熊本)

Shimon Sakaguchi: Biology and function of regulatory T Cells: Regulatory T cells and Cancer Immunotherapy (2009 2.3. London, UK)

Tomoyuki Yamaguchi: Construction of Treg cells without Foxp3 The 2nd International Symposium of WPI-IFReC (2009.2.12-13, 大阪)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 日本免疫治療学研究会学術集会(2009.2.21. 東京)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for self-tolerance and immune homeostasis the Distinguished Speaker Seminar Series at National Jewish Health. University of Colorado(2009 2.27. Colorado, USA)

Shimon Sakaguchi: Manipulation of Treg for Anti Tumor Therapy. KEYSTONE SYMPOSIA: Regulatory T Cells (2009 3.1-6. Colorado, USA)

Shimon Sakaguchi: CTLA-4-dependent mechanism of Treg-mediated in vivo and in vitro suppression. WORLD IMMUNE REGULATION MEETING-III(2009 3.22-25. Davos, Switzerland)

Shimon Sakaguchi: T cell signaling, regulatory T cells and autoimmunity. Tolerance and Development. The Foun-

- ation des Trills(2009 4.14-19. Tourtour France)
- 坂口志文：調節リウマチと T 細胞異常，第 98 回日本病理学会総会(2009.5.1-3. 京都)
- Shimon Sakaguchi：Regulatory T cells for immunological tolerance and immune homeostasis. The First International Kishimoto Foundation Symposium Immune Regulation：Present and Future(2009.5.25-27, 大阪)
- Shimon Sakaguchi：T cell signaling, regulatory T cells and self-tolerance. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference.(2009 6.1-4. 京都)
- Shimon Sakaguchi：Suppression Mechanisms of Foxp3⁺ Regulatory T Cells FOCIS 2009(2009 6.11-14. San Francisco, USA)
- Shimon Sakaguchi：Control of immune response by regulatory T cells. 45th Joint Committee Meeting Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program(2009 6.29-30. 札幌)
- Shimon Sakaguchi：T cell signaling, regulatory T cells and autoimmunity. Cellular and Genetic View on Autoimmunity. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2009(2009 7.9-10. 横浜)
- 坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 日本免疫学免疫サマースクール 2009(2009.7.15-18 淡路島)
- Shimon Sakaguchi：Control of immune responses by regulatory T cells JST-CIRM Joint meeting 2009(2009.8.31-9.1. 京都)
- Shimon Sakaguchi：Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis：towards their clinical use. TWINCORE-Symposium Infection Research and Beyond(2009.9.9-10. Hannover, Germany)
- Shimon Sakaguchi：CTLA-4 for Treg-mediated suppression, Tolerance and Immunoregulation-From basic mechanisms to therapeutic applications. Satellite Symposium of the European Congress of Immunology(2009 9.11-12. Berlin, Germany)
- Shimon Sakaguchi：CTLA-4 Dependent Mechanism of Treg-Mediated In Vivo and In Vitro Suppression in Tumor Immunity. Control of Cancer Immunosuppression, The Challenge for Cancer Vaccine Development. The XVIIth Meeting of the Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium Series(2009 9.30-10.2 New York, USA)
- Shimon Sakaguchi：T cell signaling, regulatory T cells and self-tolerance. 1st International Conference on Immune Tolerance(2009 10.25-27. Boston, U.S.A.)
- Shimon Sakaguchi：Regulatory T cells for immune tolerance and tumor immunity. International Symposium on Immunotherapy and immunodeficiency(2009 11.19-20. Heidelberg, Germany)
- 坂口志文：T 細胞シグナリングと自己免疫病 第 39 回日本免疫学会総会学術集会(2009.12.2-4 大阪)
- Shimon Sakaguchi：Immune Tolerance. 10th FIMSA(Federation of Immunological Society of Asia-Oceania) Advanced Immunology Training Course(2009.12.3-6. Australia)
- Shimon Sakaguchi：Plenary Session T cell signaling for dominant and recessive self-tolerance. ASI(Australasian Society for Immunology)39th Annual Scientific Meeting(2009.12.6-10. Gold Coast, Australia)
- 坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 京都大学再生医科学研究所－再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点 平成 21 年度 学術講演会(2009.12.14 京都)

◆ 受 賞 ◆

平成 21 年秋 紫綬褒章



生体システム制御学分野 Department of Medical Systems Control

分野主任 教授 長澤 丘司

Prof. Takashi Nagasawa

【研究概要】

リンパ球を含むすべての血液細胞やその前駆細胞は、骨の中心部の骨皮質に囲まれた空間である骨髓で造血幹細胞から一生涯にわたり恒常的に産生される。造血幹細胞や前駆細胞は、骨髓の中に想定されているニッチ(niche)と呼ばれる特別な微小環境で維持され、その増殖・分化が調節されていると推測されてきたがこの造血ニッチの実体は不明である。2000年、細胞間接着分子Eカドヘリンを介して幹細胞と接着するハエの生殖細胞幹細胞ニッチを形成する細胞が同定されたのを契機に、米国のLiらは、骨辺縁の骨芽細胞の一種でありNカドヘリンを高発現するSNO細胞が造血幹細胞ニッチを形成することを報告し注目された(Zhang, J. et al., *Nature* **425**: 836(2003))。一方、米国のMorrisonらは、造血幹細胞の多くは骨髓腔内で網の目のように分布する洞様毛細血管の周囲に存在することを報告した(Kiel, MJ. et al., *Cell* **121**: 1109(2005))。しかし、Liらの報告での造血幹細胞の組織学的観察法は十分とは言えず(Kiel, MJ. et al., *Nature* **449**: 238(2007))、いずれの報告においてもそれぞれのニッチ細胞の機能が証明されるには至っていない。

私たちは、これまでに、ケモカインCXCL12とその生理的受容体CXCR4が、胎児肝、骨髓でのBリンパ球の産生や胎生期における造血幹細胞の骨髓へのホーミング(細胞が臓器に移動、定着すること)に必須であることを明らかにし、CXCL12の生理的な発現細胞を可視化することができるCXCL12遺伝子座にGFP遺伝子を挿入したマウス(CXCL12-GFPノックインマウス)を用いて、CXCL12を高発現する細胞が胎児骨髓の血管周囲に局在し、造血幹細胞のホーミングにおけるニッチとして働いている可能性を示した(Nagasawa, T. et al. *Nature* **382**: 635-638(1996); Tachibana, K. et al. *Nature* **393**: 591-594(1998); Egawa, T. et al. *Immunity* **15**: 323-334(2001); Ara, T. et al. *Immunity* **19**: 257-267(2003))。また、成体骨髓においては、間質の細網細胞(ストローマ細胞)の一部にCXCL12を高発現する細胞(以下CXCL12-abundant reticular(CAR)細胞)が存在することを見出し、早期のBリンパ球前駆細胞や、二次リンパ器官で抗原と反応することにより最終分化し骨髓に戻ってくる形質細胞(抗体産生に特化した細胞)、未分化造血細胞分画の大部分の細胞がCAR細胞の長い細胞突起に接着していることを見出した(Tokoyoda, K. et al. *Immunity* **20**: 707-718(2004))。

更に、CXCL12欠損マウスとCXCR4欠損マウスは胎生期に致死であるため、誘導性遺伝子欠損マウスシステムを用いて成体のCXCR4遺伝子を欠損させることにより、CXCL12-CXCR4シグナルが、成体骨髓での造血幹細胞数の維持に必須であることを明らかにした。一方、造血幹細胞を濃縮する分画内の細胞は、一部の骨辺縁付近に局在する細胞を含むその大部分がCAR細胞と接着していること、洞様毛細血管の大部分はCAR細胞に取り囲まれていることを示し、骨髓腔内にびまん性に分布しCXCL12を高発現するCAR細胞が造血幹細胞ニッチの本質的な構成細胞であることを示唆した(Sugiyama, T. et al. *Immunity* **25**: 977-988(2006))。

そこで本年度は、(1)成体骨髓における造血幹細胞の局在、(2)CAR細胞の性状(どのような細胞か?)、(3)CAR細胞の生体でのニッチとしての機能、を明らかにすることを目標とした研究を進めた。(1)造血幹細胞を観察する方法は確立されていない。Liらが報告した方法では、大部分の造血幹細胞を観察できないことが最近報告され、

私たちが報告した方法では、前駆細胞を少なからず含む。また、Morrison らの方法では、幹細胞とほぼ同数の前駆細胞を含み、抗原陰性細胞を区別する高度な技術を要する。そこで、造血幹細胞をより確実に可視化するため、造血幹細胞に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いた造血幹細胞可視化法等により、造血幹細胞の骨髄における局在の解明を試みた。(2)CXCL12-GFP ノックインマウスを用いて生きたまま分離することができる CXCL12-GFP 陽性細胞分画には異なる種類の細胞が混在している可能性があるので、CXCL12-GFP 陽性細胞の遺伝子発現や性状、分化能を細胞一個レベルで解析した。(3)CAR 細胞の生理的役割を検討するため、ジフテリア毒素(DT)との結合により細胞死が誘導される DT 受容体遺伝子を用いた DTR 特異的細胞欠損システムにより CAR 細胞を特異的に欠損させることができるマウスを作製した。

自己複製能、多分化能を合わせ持つ哺乳類の組織幹細胞は、ニッチによって長期にわたり癌化することなく維持され、その分化や分化して生じた前駆細胞の増殖・分化の調節により必要な機能細胞が必要数産生される。したがって生体内のニッチの同定は、幹細胞による組織の恒常性維持や再生を制御する分子機構を理解するために重要である。更に、再生医療における幹細胞の体外での分化誘導や幹細胞の移植には生体での幹細胞とニッチとの相互作用を模倣することが重要であると考えられる。一方、近年、白血病の病態を形成する少数の白血病幹細胞が同定され、白血病幹細胞は造血幹細胞や前駆細胞から発生し、造血ニッチをニッチとして利用している可能性があることからニッチを標的とした新しい白血病治療法が注目されている。今後、私たちは、造血幹細胞・前駆細胞ニッチの同定とその機能、作用の分子機構を明らかにしたいと考えている。

Chemokines are a large family of small structurally related cytokines that are thought to regulate cell trafficking and utilize seven-transmembrane spanning G-protein-coupled receptors (GPCR). We identified CXC chemokine ligand 12 (CXCL12), also known as stromal cell-derived factor (SDF)-1 as pre-B-cell growth stimulating factor and found that CXCL12 and its primary receptor CXCR4 are essential for hematopoiesis, including colonization of bone marrow by hematopoietic stem cells (HSCs) during ontogeny, maintaining a pool of HSCs in adult bone marrow and development of B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) as well as cardiogenesis and organ vascularization during ontogeny (Nagasawa, T. et al. *Nature* **382**: 635-638 (1996); Tachibana, K. et al. *Nature* **393**: 91-94 (1998); Egawa, T. et al. *Immunity* **15**: 323-334 (2001); Ara, T. et al. *Immunity* **19**: 257-267 (2003); Sugiyama, T. et al. *Immunity* **25**: 977-988 (2006)). In recent years, we have identified a small population of non-hematopoietic cells expressing high amounts of CXCL12, termed CXCL12-abundant reticular (CAR) cells with long processes. We have revealed that CAR cells were scattered throughout bone marrow and that most HSCs, early B cell precursors, the end-stage B lymphocytes, plasma cells and pDCs were attached to the processes of CAR cells, suggesting that CAR cells function as the special microenvironments, termed 'niches' for HSCs, B lymphocytes and pDCs (Tokoyoda, K. et al. *Immunity* **20**: 707-718 (2004), Sugiyama, T. et al. *Immunity* **25**: 977-988 (2006)).

Although it has been reported that a population of osteoblasts, termed spindle-shaped N-cadherin-positive osteoblastic (SNO) cells (endosteal niches) or endothelial cells (vascular niches) function as niches for HSCs, we hypothesize that CAR cells are a key component of HSC niches, including both endosteal and vascular niches in adult bone marrow (Sugiyama, T. et al. *Immunity* **25**: 977-988 (2006)). These results raise a question what is the nature and in vivo function of CAR cells. To address this issue, we are analyzing the expression of various lineage specific genes in CAR cells and characteristics of CAR cells at the single cell level. On the other hand, we have generated and analyzed the mice that allow selective ablation of CAR cells in vivo, using a diphtheria toxin receptor (DTR)-

mediated cell knockout technique.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Tanaka, D.H., Yanagida, M., Zhu, Y., Mikami, S., Nagasawa, T., Miyazaki, J., Yanagawa, Y., Obata, K., Murakami, F.
Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. *J. Neurosci.* **29**(5): 1300-1311 (2009)
- Zhu, Y., Matsumoto, T., Mikami, S., Nagasawa, T., Murakami, F. SDF-1/CXCR4 signalling regulates two distinct processes of precerebellar neuron and its deletion leads to abnormal pontine nuclei formation. *Development* **136**(11): 1919-1928 (2009)
- Takabatake, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Matsusaka, T., Kurihara, H., Koni, P.A., Nagasawa, Y., Hamano, T., Matsui, I., Kawada, N., Imai, E., Nagasawa, T., Rakugi, H., Isaka, Y. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**(8): 1714-1723 (2009)
- Janas, M.L., Varano, G., Gudmundsson, K., Noda, M., Nagasawa, T., Turner, M. Thymic development beyond b-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. *J. Exp. Med.* 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]
- Hick, A.C., van Eyll, J.M., Cordi, S., Forez, C., Passante, L., Kohara, H., Nagasawa, T., Vanderhaeghen, P., Courtoy, P.J., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., Pierreux, C.E. *BMC Dev. Biol.* **9**: 66 (2009)
- Kitaori, T., Ito, H., Schwarz, E.M., Tsutsumi, R., Yoshitomi, H., Oishi, S., Nakano, M., Fujii, N., Nagasawa, T., Nakamura, T. *Arthritis Rheum.* **60**(3): 813-823 (2009)

2) 和文総説

- 長澤丘司, 杉山立樹: “造血幹細胞ニッチ” 再生医療 **8**, No2, 16-23.
- 長澤丘司: “ケモカイン”. ますます重要になる細胞周辺環境の科学技術(遺伝医学 Mook 別冊田畑泰彦編 メディカルドウ) (2009)
- 長澤丘司: カラー図説 “造血幹細胞と白血病” 日本臨床 **67**: 10 号. 1836-1839 (2009).

◆ 学会等の発表 ◆

1) 招待講演

- T. Nagasawa, 第 71 回 日本血液学会学術集会 ASH-JSH Joint Symposium: Hematopoietic stem cell niche, “Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and the chemokine CXCL12”. (2009.10.24. Kyoto, Japan)
- T. Nagasawa, The 2nd international symposium of WPI-IFReC, “The chemokine CXCL12 and bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells”. (2009.3.12. Osaka University, Osaka, Japan)
- T. Nagasawa, 第 8 回 日本再生医療学会総会 “The chemokine CXCL12 and bone marrow niches for hematopoietic stem cells” (2009.3.6. Tokyo, Japan)

長澤丘司 九州大学大学院歯学研究院セミナー “骨髄の造血幹細胞ニッチ (niche) とケモカイン CXCL12”
(2009.11.26. 福岡)

長澤丘司 奈良先端科学技術大学院大学公開セミナー “造血幹細胞ニッチとケモカイン CXCL12” (2009.11.05.
奈良)

長澤丘司 京都大学再生医科学研究所 第4回公開講演会 “幹細胞はどこにいる～旅する血液・免疫系幹細胞と白血病” (2009.09.26. 京都)

長澤丘司 日本免疫学会 免疫サマースクール 2009 “造血幹細胞, 免疫担当細胞のニッチとケモカイン CXCL12” (2009.07.16. 淡路兵庫)

長澤丘司 4 研究所 Joint Forum “造血幹細胞・免疫担当細胞のニッチとケモカイン CXCL12/CXCR4 シグナル”
(2009.01.07. 熊本)

生体再建学分野 Department of Tissue Reconstruction

客員准教授 池川 志郎

Visiting Assoc. Prof. Shiro Ikegawa

【研究概要】

われわれは、変形性関節症、骨粗鬆症、椎間板ヘルニア、後縦靱帯骨化症、強直性脊椎炎といった骨・関節の難病、生活習慣病の遺伝的要因を明らかにすることを目指している。これらの疾患は、いずれも多くを苦しめている「ありふれた」疾患 (common disease) である。たとえば、変形性関節症は、我が国だけでも、1,000 万人以上もの患者さんがいる。椎間板ヘルニアで手術を受ける患者さんは年間 5 万人以上である。これら骨・関節の common disease/生活習慣病は、痛みや関節の機能障害のために多くの患者さんの QOL を損なっている。また、加齢と共にその頻度が急速に増大するものが多く、高齢化社会の到来と共に、病気に苦しむ患者さんだけでなく、社会全体にとっても大きな問題になっている。しかし、どれも目下の所、根本的な治療手段がない。

これらの疾患は、複数の遺伝因子 (疾患感受性遺伝子) と環境因子 (運動、栄養などの) の相互作用により発症する多因子遺伝病と考えられる。分子遺伝学、ゲノム医学的手法を用いて、目の前の現実の患者の病気を出発点に、感受性遺伝子を同定し、分子レベルで病態を解明し、画期的な診断法・治療法を開発したい。またその過程で、骨格の形成や骨・軟骨の成長、発達のメカニズムを解明していきたい。

Recent advance in molecular genetics has revealed genetic factors play a critical role in etiology and pathogenesis of “common” diseases. Our goal is to clarify the genetic factors implicated in the etiology of common bone and joint diseases including osteoarthritis, lumbar disc herniation, osteoporosis, ankylosing spondylitis. Though genetic analysis including genome-wide linkage and association studies, we will identify and characterize susceptibility genes of the diseases and clarify their molecular mechanism.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Smits P, Bolton AD, Funari V, Hong M, Boyden E, Lu L, Manning DK, Dwyer ND, Moran JL, Prysak M, Merriman B, Nelson SF, Bonafe L, Superti-Furga A, Ikegawa S, Krakow D, Cohn DH, Kirchhausen T, Warman ML, Beier DR. : Abnormal Golgi architecture and lethal skeletal dysplasia in mice and humans lacking the Golgin GMAP-210. *New Engl J Med*. **362** (3): 206-216(2010)
- Saito A, Hino S, Murakami T, Kanemoto S, Kondo S, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Imaizumi K. : Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nat Cell Biol*. **11** (10): 1197-1204(2009)
- Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H, Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, Imaizumi K. : Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol*. **11** (10): 1205-1211(2009)
- Furuichi T, Kayserili H, Hiraoka S, Nishimura G, Ohashi H, Alanay Y, Llerena J Jr, Aslanger AD, Koseki H, Cohn DH, Superti-Furga A, Unger S, Ikegawa S. : Identification of loss-of-function mutations of SLC35D1 in patients with Schneckenbecken dysplasia, but not with other severe spondylodysplastic dysplasias group diseases. *J Med Genet*. **46** (8): 562-568(2009)
- Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I, Karassa FB, Loughlin J, Carr A, Doherty M, Doherty S, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A, Halldorsson BV, Hauksson VB, Hofman A, Hart DJ, Ikegawa S, Ingvarsson T, Jiang Q, Jonsdottir I, Jonsson H, Kerkhof HJ, Kloppenburg M, Lane NE, Li J, Lories RJ, van Meurs JB, Nakki A, Nevitt MC, Rodriguez-Lopez J, Shi D, Slagboom PE, Stefansson K, Tsezou A, Wallis GA, Watson CM, Spector TD, Uitterlinden AG, Valdes AM, Ioannidis JP. : Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis Rheum*. **60** (6): 1710-1721(2009)
- Karasugi T, Semba K, Hirose Y, Kelempisioti A, Nakajima M, Miyake A, Furuichi T, Kawaguchi Y, Mikami Y, Chiba K, Kamata M, Ozaki K, Takahashi A, Mäkelä P, Karppinen J, Kimura T, Kubo T, Toyama Y, Yamamura KI, Männikkö M, Mizuta H, Ikegawa S. : Association of the tag SNPs in the human SKT Gene(KIAA1217) with lumbar disc herniation. *J Bone Miner Res*. **24** (9): 1537-1543(2009)
- Ozaki K, Sato H, Inoue K, Tsunoda T, Sakata Y, Mizuno H, Lin TH, Miyamoto Y, Aoki A, Onouchi Y, Sheu SH, Ikegawa S, Odashiro K, Nobuyoshi M, Juo SH, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. : SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian populations. *Nat Genet*. **41** (3): 329-333(2009)
- Meulenbelt I, Chapman K, Dieguez-Gonzalez R, Shi D, Tsezou A, Dai J, Malizos KN, Kloppenburg M, Carr A, Nakajima M, van der Breggen R, Lakenberg N, Gomez-Reino JJ, Jiang Q, Ikegawa S, Gonzalez A, Loughlin J, Slagboom EP. : Large replication study and meta-analyses of DVWA as an osteoarthritis susceptibility locus in European and Asian populations. *Hum Mol Genet*. **18** (8): 1518-1523(2009)
- Mori S, Kou I, Sato H, Emi M, Ito H, Hosoi T, Ikegawa S. : Nucleotide variations in genes encoding carbonic anhydrase 8 and 10 associated with femoral bone mineral density in Japanese female with osteoporosis. *J Bone*

Miner Metab. **27**(2): 213-216(2009)

Ni H, Shi D, Dai J, Qin J, Xu Y, Zhu L, Yao C, Shao Z, Chen D, Xu Z, Yi L, Ikegawa S, Jiang Q.: Genetic polymorphisms of interleukin-1beta(-511C/T) and interleukin-1 receptor antagonist (86-bpVNTR) in susceptibility to knee osteoarthritis in a Chinese Han population. Rheumatol Int. **29**(11): 1301-1305(2009)

Cheung CL, Chan BY, Chan V, Ikegawa S, Kou I, Ngai H, Smith D, Luk KD, Huang QY, Mori S, Sham PC, Kung AW.: Pre-B-cell leukemia homeobox 1(PBX1) shows functional and possible genetic association with bone mineral density variation. Hum Mol Genet. **18**(4): 679-687(2009)

2) 総 説

Dai J, Ikegawa S. Recent advances in association studies of osteoarthritis susceptibility genes. J Hum Genet.(in press)

◆ 学会等の発表 ◆

講演・シンポジウム

池川志郎：骨関節疾患のゲノム解析，京大再生研セミナー(2009.1.19 京都)

池川志郎：骨系統疾患の基礎，第2回日本イアンドナルドアドバンストセミナー(2009.2.7 大阪)

池川志郎，古市 達哉：基礎と臨床を統合した，ヒトとマウスの遺伝学による疾患遺伝子へのアプローチと骨関節疾患の病態の解明，第1回 新潟プロテオグリカン研究会(2009.3.6 新潟)

池川志郎：ゲノム解析による変形性関節症へのアプローチ・基礎から最新の動向まで，技術情報協会：セミナー：変形性関節症における発症／進行機序・診断および治療薬開発(2009.3.7 東京)

池川志郎：マウスとヒトの融合遺伝学アプローチによる新規のトランスポーター病の同定と分子病態の解明，日本薬学会 第129年会(2009.3.26 京都)

池川志郎：骨・関節の疾患のゲノム解析，理化学研究所・東京大学医科学研究所合同セミナー(2009.4.7 東京)

池川志郎：OAの病態と診断－疾患感受性遺伝子から，第53回日本リウマチ学会総会・学術総会，第18回国際リウマチシンポジウム(2009.4.25 東京)

Ikegawa S.: Molecular genetics of skeletal dysplasia - How to identify the new genes.(Invited Seminar in Dept. Orthop. Surg.)(2009.5.4 Nanjing)

Ikegawa S.: Genetic study of bone and joint diseases.(Invited Seminar in Model Animal Research Center)(2009.5.6 Nanjing)

Ikegawa S.: Integrated approach toward bone & joint diseases using human and mouse genetics. Yokosuka Science Festa 2009(Joint Conference of 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium(PPCTSS), 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research(JSCTR), and 56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club(JMC) Concurrent Meeting: Yokosuka International Conference on Cancer Microenvironments(YICCM))(2009.6.4 Yokosuka)

Ikegawa S.: From mouse to human, from monogenic to polygenic disease. Gordon Research Conference Cartilage Biology & Pathology (Invited Seminar)(2009.6.8 Les Diablerets)

Ikegawa S.: Genetics of bone and joint diseases.(Invited Seminar)(2009.6.18 Larissa)

Ikegawa S.: Genetics study of skeletal dysplasias focusing on the relation with common diseases. (Invited Seminar)
(2009.6.19 Larissa)

Ikegawa S.: Combined approach for bone and joint diseases using mouse and human genetics. (Invited Seminar)
(2009.6.20 Larissa)

Ikegawa S.: Common polymorphisms and risk for degenerative joint diseases in human populations. 9th Biennial
Meeting of International Skeletal Dysplasia Society (2009.7.19 Boston)

池川志郎：骨・関節疾患のゲノム解析，日本人類遺伝学会第54回大会(2009.9.24 東京)

池川志郎：遺伝子診断上の注意点：ラボ／基礎サイドから，第2回胎児骨系統疾患フォーラム(2009.9.24 東京)

池川志郎：骨・関節疾患のゲノム解析，第11回日本骨粗鬆症学会骨ドック・健診分科会(2009.10.15 名古屋)

Ikegawa S.: Integrated approach toward bone and joint diseases using human and mouse genetics. The 9th Annual
Meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies (Invited lecture) (2009.11.19 Seoul)

Ikegawa S.: Genetics of bone and joint diseases. (Invited Seminar) (2009.6.20 Seoul)

Ikegawa S.: Genomic analysis of bone and joint diseases-An integrated approach of human and mouse genetics.
(Invited Seminar) (2009.11.27 Perth)

生体組織工学研究部門

生体分子設計学分野 Department of Cellular Differentiation

分野主任 教授 開 祐司

Prof. Yuji Hiraki

【研究概要】

本研究分野では、組織血管化、軟骨・腱・靱帯形成とその再生修復の分子機構の解明を主たるテーマとして、動物モデル、細胞培養系を駆使して分子レベルでの解析を行っている。現在の研究テーマは、以下の通りである。

1. Chondromodulin-I に関する研究

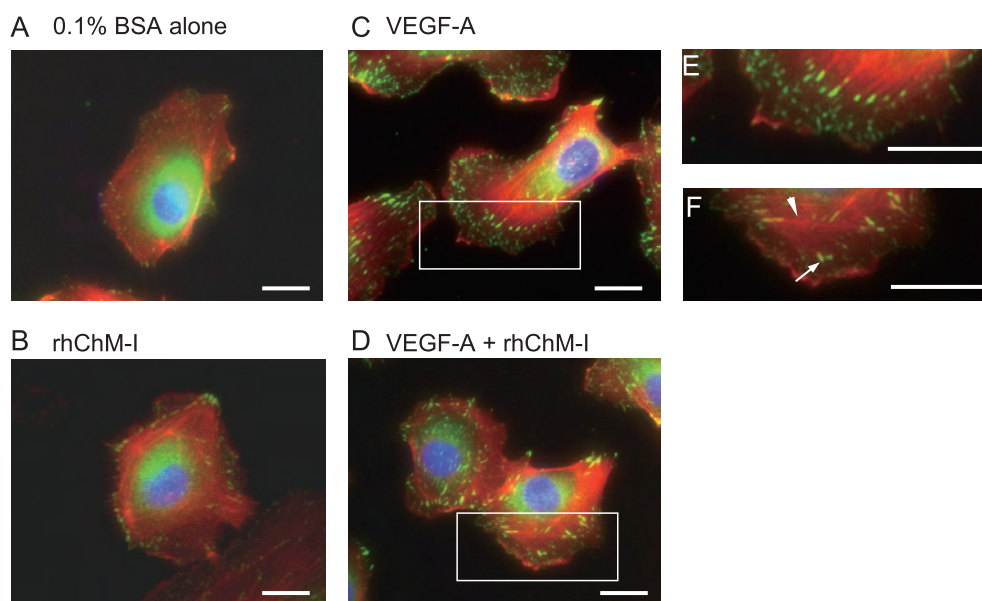
我々は、ウシ胎仔骨端軟骨から血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) を精製・クローニングした。ChM-I は主に軟骨や心臓弁などの無血管に保たれる間葉組織に特異的に発現し、血管内皮細胞の遊走・増殖・管腔形成阻害活性を示す。さらに、ChM-I ノックアウトマウスの解析では、加齢に伴い心臓弁に異常な血管化が惹起されることから、ChM-I が組織の無血管性維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、血管内皮細胞に対する ChM-I の作用機序については十分に解明されていない。そこで、組換えヒト ChM-I タンパク質 (rhChM-I) を調製し、ChM-I が示す最も初期の血管新生抑制応答の一つである内皮細胞遊走に対する阻害作用について詳細に検討した。rhChM-I は Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) のみならず、Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) や Insulin-like Growth Factor-I など種々の遊走刺激へのヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) のケモタキシスを阻害した。その阻害活性は約 5 nM の ID₅₀ 値を示し、対照として用いた Endostatin と同等以上に強力であった。また、FGF-2 へと遊走する線維芽細胞に対しては全く阻害作用を示さなかった。これらの結果から、ChM-I は血管内皮細胞に特異的に作用することが示唆された。rhChM-I 存在下に VEGF-A 刺激に伴う HUVECs のアクチン細胞骨格および接着斑の再構成は著明に阻害され、Rac1 およびアクチン脱重合因子 cofilin の活性制御に異常が認められたことから、葉状仮足形成の異常が遊走能低下の大きな要因であると考えられた。これらの結果を支持するように、タイムラプスにより HUVECs の細胞運動を観察すると、rhChM-I 処理細胞では、VEGF-A によって誘導される持続的な葉状仮足の形成が阻害され、一過性の仮足形成が高頻度に認められて、細胞の移動速度、定方向性が顕著に低下していた。また、これらの阻害作用は、VEGF-A 未刺激で基底状態の HUVECs の運動性に対しては、ほとんど認められなかった。従って、ChM-I は刺激依存的なアクチン細胞骨格の再構成を阻害することにより葉状仮足の伸長を不安定化して、細胞の運動性を抑制することが明らかとなった。Endostatin や Tumstatin, Thrombospondin-1 など、これまでに知られている基底膜由来血管新生抑制因子の多くは、特定のインテグリンあるいは VEGF-A シグナルの遮蔽などを介して作用することが報告されているが、ChM-I の阻害作用はいずれにも依存していなかった。このことは、ChM-I が特異な作用ターゲットを有するユニークな血管新生抑制因子であることを示唆している。

2. 軟骨性骨原基の血管侵入障壁に関する研究

内軟骨性骨形成では、血管侵入を契機に、無血管の軟骨から骨・骨髄への置換が開始される。この軟骨への血管

侵入は、時間的にも空間的にも極めて厳密に制御されているが、その分子機構には不明な点が多い。そこで、軟骨に発現している VEGF-A isoform をマウス及びニワトリ胚前肢に過剰発現させることによって血管新生を亢進させ、内軟骨性骨形成の進展に伴う軟骨の血管侵入抵抗性の変化を解析した。その結果、いずれの VEGF-A isoform を過剰発現させても、軟骨と軟骨膜を含む軟骨周囲組織は無血管に保たれていた。すなわち、内軟骨性骨形成の初期には、軟骨と軟骨周囲組織という 2 種類の異なった血管侵入障壁が存在することが明らかになった。しかしながら、骨髄の形成に続いて、heparin や neuropilin と相互作用する VEGF-A₁₄₆, VEGF-A₁₆₆, VEGF-A₁₉₀ を過剰発現している前肢では、早期に軟骨膜が血管化された。一旦、軟骨膜が血管化されると、骨髄では MMP9 陽性の破骨細胞が出現し、血管侵入部位では骨格系細胞で MMP9 や MMP13 の遺伝子発現を誘導する TGF- β のシグナリングが活性化され、軟骨への血管侵入が誘導された。一方、heparin に結合しない VEGF-A₁₂₂ や neuropilin と相互作用する領域を欠失した VEGF-A₁₆₆ Δ E₁₆₂-R₁₆₆ を過剰発現させても、早期の軟骨膜血管化や軟骨への血管侵入は観察されなかった。従って、軟骨への血管侵入に先立つ軟骨膜血管化では、無血管の軟骨周囲組織が VEGF-A の isoform 特異的な応答能を獲得し、血管侵入抵抗性を失うプロセスが存在することが明らかになった。

The proper growth and differentiation signaling from the surrounding extracellular environment regulates tissue formation and its functions. We are aiming at the elucidation of molecular interactions and signaling networks



ChM-I による VEGF-A 刺激に伴うアクチン細胞骨格の再構成異常

低血清条件下で培養した HUVECs を 0.1% BSA/PBS (A および C) または rhChM-I (1 μ g/ml) (B または D) と 30 分間保持し、VEGF-A (25 ng/ml) を添加することにより、1 時間刺激した (C-F) 後、細胞を固定して免疫染色を行なった。抗 Paxillin 抗体 (緑色) を用いて細胞接着斑 (focal adhesion) を染色し、ファロイジン (赤色) および DAPI (青色) でアクチンフィラメントおよび核をそれぞれ可視化した。パネル (C) および (D) の四角で囲んだ領域はパネル (E) および (F) にそれぞれ拡大して示してある。rhChM-I 処理細胞では VEGF-A 刺激に伴って形成されるアクチンフィラメントと接着斑の数が減少し、その配向性もランダムになっている。パネル (F) 内の矢頭および矢印は ChM-I 存在下に形成される短いアクチンフィラメントとアクチンフィラメントへの接続が認められない接着斑をそれぞれ示している。スケールバー: 20 μ m。

ChM-I disturbs VEGF-A-induced reorganization of actin cytoskeleton in HUVECs.

Serum-starved HUVECs were preincubated with 0.1% BSA/PBS (A and C), or rhChM-I (1 μ g/ml) (B and D) for 30 min. The cells were then stimulated with VEGF-A (25 ng/ml) (C-F) for 1 h, fixed, permeabilized, and immunostained. Focal adhesions (green) were visualized with anti-paxillin antibody, and actin filaments (red) and nuclei (blue) were stained with phalloidin and DAPI, respectively. The boxed areas in panel (C) and (D) are magnified in (E) and (F), respectively. Note that rhChM-I-treated cells exhibited the reduced number of actin filaments and focal adhesions, and they were randomly oriented each other, upon VEGF-A stimulation. The arrowhead and arrow in panel (F) indicate the shorter actin filaments and the focal adhesion poorly linked to actin filaments, respectively. Bars, 20 μ m.

underlying mesenchymal vascularization or cartilage, bone and tendon/ligament formation. Our current research efforts are focused on the following studies.

1. Functional analysis of Chondromodulin-I

We have previously purified and cloned Chondromodulin-I (ChM-I) as an angiogenesis inhibitor from fetal bovine cartilage based on the growth inhibitory activity of vascular endothelial cells (ECs). ChM-I is expressed in the avascular zones of cartilaginous molds and cardiac valves, and has been shown to inhibit the migration, proliferation, and tube morphogenesis of cultured ECs. Recently, we have demonstrated that the aged mice lacking ChM-I exhibit abnormal angiogenesis in cardiac valves, suggesting the essential role of ChM-I in maintaining the tissue avascularity. Despite these evidences showing the activity of ChM-I *in vivo* and *in vitro*, the molecular mechanism of the ChM-I actions remains to be elucidated. To address this issue, we have prepared recombinant human ChM-I (rhChM-I) and examined its effects on EC migration, an early regulatory step in angiogenesis. In a modified Boyden chamber assay, ChM-I inhibited the chemotactic migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) as well as by Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) and Insulin-like Growth Factor-I. The inhibitory activity was comparable to that of Endostatin, a cryptic angiogenesis inhibitor derived from type XVIII collagen. No inhibitory effect was observed on the chemotactic migration of fibroblastic cells toward FGF-2. Therefore, it appears that ChM-I specifically acts on the ECs actively migrating toward the chemoattractants. These actions involved the disturbed reorganization of actin cytoskeleton and focal adhesions in VEGF-A-stimulated ECs. Consistent with this, VEGF-A-induced activation of Rac1 and phosphorylation of cofilin were suppressed in HUVECs, which leads to the dysregulation of actin polymerization. Furthermore, time-lapse microscopic analysis revealed that ChM-I inhibits the persistent extensions of lamellipodia and evokes frequent alterations of moving front, coincident with the reduced motility and directionality of ECs upon VEGF-A stimulation. These data showed that ChM-I impairs the VEGF-A-stimulated motility of ECs through the destabilization of lamellipodial extensions. Moreover, integrin-mediated cell adhesion or VEGF signaling was not the direct target of ChM-I, supporting the idea that ChM-I acts through a unique signal pathway that regulates the EC motility.

2. Analysis of the anti-angiogenic property of the cartilaginous bone primordium during endochondral bone formation

During endochondral bone formation, vascular invasion initiates the replacement of avascular cartilage by well-vascularized bone and bone marrow. Vascular invasion into the cartilaginous bone primordium occurs in a strictly spatio-temporally defined manner, but the molecular mechanism for this process is still poorly understood. By utilizing a VEGF-A mediated gain of function approach in mouse and chick, we investigated the cellular and molecular events associated with angiogenic switching during endochondral bone formation. Cartilage-specific overexpression of VEGF-A₁₆₄ in transgenic mice results in the hypervascularization of soft connective tissues away from cartilage. Unexpectedly, perichondrial tissue remained avascular in addition to cartilage. Hypervascularization similarly occurred when various VEGF-A splicing variants (VEGF-A₁₂₂, VEGF-A₁₄₆, VEGF-A₁₆₆, VEGF-A₁₉₀) were overexpressed in the chick forelimb, but also in this case perichondrial tissue and cartilage were completely devoid of blood vessels. However, following formation of the bony collar, anti-angiogenic properties in perichondrial tissue

were lost and perichondrial angiogenesis was accelerated by VEGF-A₁₄₆, VEGF-A₁₆₆, or VEGF-A₁₉₀. Once the perichondrium was vascularized, osteoclast precursors were recruited from the circulation to the bony collar to differentiate into MMP9 positive osteoclasts and then the induction of MMP9 and MMP13 was observed in association with the activation of TGF- β signaling. Neither perichondrial angiogenesis nor the subsequent cartilage vascularization was accelerated by the non-heparin-binding VEGF-A₁₂₂ or by the VEGF-A₁₆₆ Δ E₁₆₂-R₁₆₆ mutant lacking a neuropilin-binding motif. Thus, perichondrial angiogenesis is a prerequisite event for the subsequent vascular invasion into cartilage and is differentially regulated by VEGF-A isoforms.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Anraku, Y., Mizuta, H., Sei, A., Kudo, S., Nakamura, E., Senba, K., and Hiraki, Y.: Analyses of early events during chondrogenic repair in rat full-thickness articular cartilage defects. *J. Bone Min. Metab.* **27**(3):272-286 (2009)
- Zhou, H., Kepa, J.K., Siegel, D., Miura, S., Hiraki, Y., and Ross, D.: The roles of chondromodulin-I and NQO1 in the inhibition of tube formation induced by the benzene metabolite hydroquinone in human bone marrow endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **76**(3):579-587 (2009)
- Takimoto, A., Nishizaki, Y., Hiraki, Y., and Shukunami, C.: Differential actions of VEGF-A isoforms on perichondrial angiogenesis during endochondral bone formation. *Dev. Biol.* **322**(2):196-211 (2009)
- Hosokawa, Y., Iguchi, S., Yasukuni, R., Hiraki, Y., Shukunami, C., and Masuhara, H.: Gene Delivery Process in Single Animal Cell after Femtosecond Laser Microinjection. *Appl. Surface Sci.* **255**(24):9880-9884 (2009)
- Miura, S., Mitsui, K., Heishi, T., Shukunami, C., Sekiguchi, K., Kondo, J., Sato, Y., Hiraki, Y.: Impairment of VEGF-A-stimulated lamellipodial extensions and motility of vascular endothelial cells by chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitor. *Exp. Cell Res.* **316**(5):775-788 (2010)

2) 総説

- 開 祐司, 滝本 晶, 宿南知佐: 血管新生抑制. *炎症と免疫*. **17**(6):656-661 (2009)
- Hiraki, Y., Miura, S., Nishizaki, Y., and Shukunami, C.: Chondromodulin-I: A Growth-Modulating Functional Matrix in Cartilage. *Inflammation Regeneration*. **29**(5):317-323 (2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 草深公秀, 村松浩二, 嵩眞佐子, 林昭伸, 村田哲也, 久力権, 渡辺秀人, 開祐司, 宿南知佐, 望月徹, 中島孝: 乳腺原発 matrix-producing carcinoma (MPC) における基質とは何か? 第 98 回日本病理学会総会 (2009.5.1-3 京都)
- Takimoto, A., Nishizaki, Y., Hiraki, Y., Shukunami, C.: Differential actions of VEGF-A isoforms on perichondrial an-

giogenesis during endochondral bone formation. GRC Conference on Cartilage Biology & Pathology (2009.6.13-14 Les Diablerets, Switzerland)

Nishizaki, Y., Sugimoto, Y., Hiraki, Y., Shukunami, C.: Identification of tendon specific enhancer of the mouse tenomodulin gene. GRC Conference on Cartilage Biology & Pathology (2009.6.13-14 Les Diablerets, Switzerland)

宿南知佐, 滝本 晶, 西崎有利子, 開 祐司: 軟骨性骨原基の2つの血管侵入障壁. 第10回運動器科学研究会 (2009.9.18-19 東京)

杉本由紀, 滝本 晶, 開 祐司, 宿南知佐: 腱・靱帯形成における sox9 の役割. 第10回運動器科学研究会 (2009.9.18-19 東京)

西崎有利子, 杉本由紀, 滝本 晶, 開 祐司, 宿南知佐: Tenomodulin 遺伝子の腱・靱帯特異的な転写制御領域の同定 (Identification of the tendon and ligament enhancer element in the mouse Tenomodulin gene.). 第82回日本生化学会大会 (2009.10.21-24 神戸)

Sugimoto, Y., Masago, Y., Nagata, K., Hiraki, Y., Shukunami, C.: Generation of conditional knockout mice lacking Hsp47 in the tendon cell lineage. Global COE International Symposium / Retreat 2009 (2009.11.6-8 淡路)

2) 講演・シンポジウム

開 祐司: 骨・軟骨形成における血管侵入抵抗性の制御. 神戸大学 整形外科セミナー (2009.2.5. 神戸)

Chisa Shukunami: Development of the hypovascular mesenchyme: cartilage and tendon - New aspects on the anti-angiogenic barrier. Gemeinsamen Kolloquium des Sonderforschungsbereichs 592 und der Graduiertenkollegs 1104 und 1305 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (2009.6.18 Freiburg, Germany)

開 祐司: 私の軟骨研究 - Anti-angiogenic Barriers in Mesenchymal Structures -. 神戸薬科大学 生化学セミナー (2009.7.21 神戸)

開 祐司: 血管侵入抵抗性障壁を作る細胞外環境. 第17回日本血管生物医学会(東京, 東京大学安田講堂)シンポジウム5 血管多様性と活性化転写シグナル, エピゲノム制御 (2009.10.8-9 東京)

宿南知佐: 運動器の連結システムの形成機構. 第82回日本生化学会大会 (2009.10.21 神戸)

生体材料学分野 Department of Biomaterials

分野主任 教授 田畑 泰彦
Prof. Yasuhiko Tabata

【研究概要】

本研究分野の目的は、医療に应用可能あるいは基礎生物医学研究に役立つ方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体材料とは、体内で使用したり、あるいはタンパク質、細胞などの

生体成分と直接に接触する状況で用いられる材料のことであり、本研究分野においては、高分子、金属、セラミックス、およびそれらのコンポジットからなる生体材料のデザインと創製を行い、得られた生体材料の基礎生物学および医療への応用を目指している。具体的には、生体組織・臓器の再生誘導治療(一般には、再生医療と呼ばれている)および再建外科治療に用いられる医用材料、人工臓器のための生体材料、あるいは薬物・遺伝子治療、予防ワクチン、および診断効率の向上を目指したドラッグデリバリーシステム(DDS)のための生体材料の研究開発を行っている。加えて、幹細胞の分子生物学、生化学、細胞生物学の研究、および細胞培養のために必要不可欠な生体材料についての研究開発も進めている。

再建外科治療をアシストする生体材料の生体適合性はまだまだ低く、その代行できる生物機能も単一であることから、臨床上、患者に高い Quality of Life(QOL)を与えることが困難である場合が多い。また、臓器移植もドナー不足に加えて、免疫拒絶抑制剤の副作用にともなう問題もある。このように、再建外科と臓器移植との現在の2大先端外科治療に限界が見えてきている状況の中で生まれてきたのが、細胞の増殖・分化能を活用、生体本来のもつ自然治癒力を介して、生体組織の再生修復によって病気を治療しようという試みである。この再生誘導治療の試みが医療応用できるようになれば、再建外科と臓器移植治療に続く第3の治療法となることは疑いない。この再生誘導治療は生体材料に依存しない点、免疫抑制剤を必要としない点で、前述の2大治療法とは大きく異なる。再生誘導治療の目的は、細胞を利用した生体組織の再生誘導と臓器機能の代替による病気の治療である。この実現には、再生現象にかかわる増殖・分化ポテンシャルの高い(幹)細胞とその周辺環境の基礎生物医学研究が必要であることはいままでもないが、それに加えて、細胞の増殖、分化を促し、生体組織の再生を誘導するための環境(場)を与えることが不可欠である。別な言い方をすれば、再生誘導治療とは、細胞やその周辺環境をうまく設定することによって、本来、体のもっている自然治癒力を高めて、病気の治療を行うという、体にやさしい理想的な治療法である。この生体組織(Tissue)の再生誘導の場を構築するための医工学(Engineering)的な技術・方法論が生体組織工学(Tissue Engineering)である。

生体組織工学の基本アイデアは、生体組織の構成成分である細胞、細胞の増殖・分化のための足場、および生体シグナル因子(細胞増殖因子と遺伝子)をうまく組み合わせることで、生体組織の再生誘導を実現することである。このためには生体材料の利用が必要不可欠であり、特に、生体内で分解吸収され消失する材料(生体吸収性材料)と3つの要素とを組み合わせ、生体組織の再生を誘導する。この再生誘導に適切な生体吸収性を金属やセラミックスにもたせることは難しく、この観点から、生体組織工学では主として高分子材料が利用されている。生体吸収性材料の利点は、材料の生体内での役割が果たされた後に、その場から消失するため、再び取り除く必要がなく、また、材料が吸収されるために、材料が生体組織・臓器の再生過程を妨げないことである。生体材料が生体組織の再生修復とともに吸収されれば、材料に対する問題となる生体反応の心配もなく、また、細胞を患者自身から採取することができれば、免疫拒絶反応もなく、理想的な治療法となる。DDS(ドラッグデリバリーシステム、薬物送達法)および生物医学研究のための材料にも生体吸収性が要求される場合が多い。

本研究分野では、生体吸収性の高分子材料を中心とした生体組織・臓器の再生誘導治療のための生体材料、薬物、遺伝子治療、予防、診断、などに必要な DDS のための生体材料、分子生物学、生化学、細胞生物学、細胞培養、および幹細胞研究のための生体材料、あるいは外科および内科治療補助のための生体材料の研究を行っている。以下にその内容をより詳しく述べる。

1) 生体組織の再生誘導治療のための生体材料

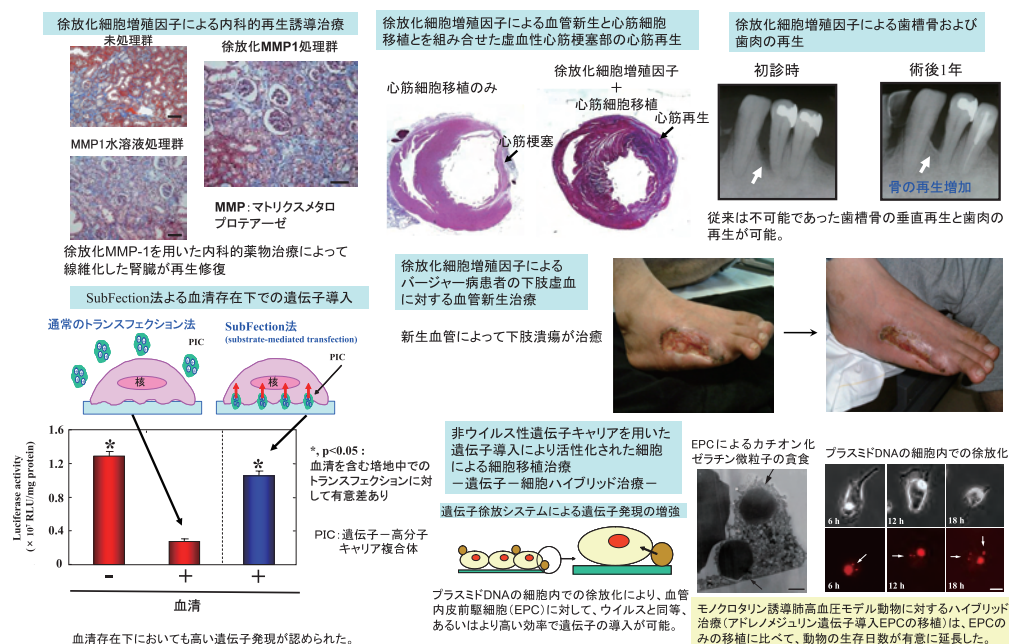
血液細胞以外のほとんどの細胞は、生体内では細胞外マトリックスと呼ばれる増殖・分化のための足場材料に接

着して存在，その生物機能を発現している．そのため，生体組織が大きく欠損した場合には，この足場も失われるため，欠損部に細胞のみを補うだけでは生体組織の再生誘導を望めない場合が多い．そこで，再生誘導を期待する部位に細胞の増殖・分化を促すための仮の足場を与える必要がある．本研究分野では，この細胞の足場としての3次元あるいは多孔質構造をもつ生体吸収性の成形体(人工細胞外マトリックス)をデザイン，創製している．しかしながら，いかに足場が優れていても，細胞の数が少なかったり，細胞を増殖させるための生体シグナル因子が足りなければ，生体組織の再生誘導は望めないであろう．このような場合，細胞の増殖・分化を促す細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を用いるのが1つの現実的な解決法である．しかしながら，これらの生体シグナル因子は生体内での寿命が短く不安定であるため，その利用には投与上の工夫が必要である．この工夫がDDSである．たとえば，生体吸収性材料に細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を包含させ，再生部位で徐々に放出(徐放)する．この徐放化技術によって，生体シグナル因子の生物活性が効率よく発揮され，その結果として，種々の生体組織・臓器の再生誘導が促進されることがわかってきている．現在，この細胞増殖因子の徐放化技術を利用した血管，骨，歯周組織などの再生誘導治療の臨床研究が始まっている．本研究分野では，この徐放化担体のための生体材料をデザイン，創製している．

一般に，拡張型心筋症，慢性腎炎，肝硬変，肺線維症など慢性疾患では，病的部位が線維性組織で占められ，臓器機能が不全に陥っていることが多い．そこで，内科的な薬物，遺伝子治療によって，この線維性組織を消化分解することができれば，周辺の正常組織の再生誘導能によって病的部位は再生修復され，慢性線維性疾患の内科的な再生誘導治療が実現できる．本研究分野では，このアイデアを基に病的部位への薬物・遺伝子のターゲティングおよび局所徐放化による難治性慢性線維性疾患に対する内科的再生誘導治療を行っている．この再生誘導治療の概念は，生体のもつ再生誘導能力を活用するという点で，上述の足場やDDS技術を用いた外科的再生誘導治療と同じであり，今後は外科治療だけではなく，内科治療に対しても，重要となっていくと考えられる．

2) 幹細胞工学および基礎生物医学研究のための生体材料

再生誘導治療には，2つのアプローチがある．1つは前述の生体組織工学をベースとした生体組織の再生誘導治療である．もう1つが，増殖・分化ポテンシャルの高い幹細胞を利用する細胞移植治療である．後者のためには，臨床応用可能な十分な数と質のそろった細胞を調製することが重要となる．本研究分野では，この細胞移植治療に不可欠である幹細胞，前駆細胞，および芽細胞などを効率よく得ることを目的として，それらの細胞の単離，増殖，分化のための培養基材および培養技術について研究開発を行っている．従来の細胞培養法に加えて，種々の生体材料からなる培養基材あるいは培養装置(バイオリアクタ)の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している．これらの一連の研究は，単に再生誘導治療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけではなく，広く，細胞の増殖・分化，形態形成に関する生物医学の基礎研究にも応用できる生体材料，技術，方法論を提供することも大きな目的である．この技術は細胞を用いた薬の代謝，毒性を評価する創薬研究にも応用できる．加えて，細胞機能の解析および細胞の遺伝子改変を目的として，遺伝子導入，発現のための非ウイルスキャリアーのデザインと創製を行っている．幹細胞を利用した細胞移植治療では，時として，細胞の再生誘導能力不足が問題となる場合がある．これを解決する1つの方法として，遺伝子導入による幹細胞の活性化(遺伝子による機能改変)が有望であり，広く行われている．これまでに，ウィルスベクターを用いた遺伝子導入が行われているが，ウィルスを用いていることから，その臨床応用はきわめて難しい．そこで，非ウイルスキャリアーを用いた幹細胞の生物機能の活性化法の研究開発が強く望まれている．この1つの成果として，遺伝子を幹細胞内で徐放化する技術を開発した．この技術を利用することによって，ウィルスと同程度あるいはそれよりも高いレベルの遺伝子発現が実現できた．さ



さらに、遺伝子により活性化した幹細胞を用いることによって、より高い細胞移植治療効果が認められることがわかった。また、遺伝子と非ウイルスキャリアとが固定化された基材上で細胞を培養、さらにバイオリアクタを組み合わせることによって、細胞への遺伝子導入発現効率を高める(SubFection: substrate-mediated transfection)技術も開発している。非ウイルス性キャリアを用いて、プラスミドDNAやsiRNAを細胞内に効率よく取り込ませ、細胞の生物機能や分化を制御することも可能となっている。これらの一連の物質導入技術は、細胞の生物機能の改変に有用であり、その対象となる物質は遺伝子だけでなく、small interfering RNA (siRNA)などの核酸物質、低分子、ペプチド、タンパク質などの細胞内導入法としても利用可能である。

3) DDSのための生体材料

薬物が効くのは、薬物がその作用部位に適切に作用するからである。しかしながら、現実には、薬物は部位選択性がなく、その薬理作用を発現させるために大量投与が行われている。これが薬物の副作用の主な原因となっている。そこで、薬物を必要な部位へ、必要な濃度で、必要な時期にだけ働かせるための試みが行われている。これがDDSである。DDSの目的は、薬物の徐放化、薬物の長寿命化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲティングなどである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、生体材料学の観点からの治療薬物と治療遺伝子のためのDDS研究を行っている。

これまでの研究の経緯から、DDSの対象薬物は治療薬であった。しかしながら、DDSとは生物活性をもつ物質を全て薬物と考え、それと生体材料とを組み合わせることで、薬物の生物活性を高めることを目的とした技術・方法論である。つまり、DDSの対象物は、治療薬だけではなく、予防薬、診断薬、化粧品成分、ヘルスケア物質などである。このような観点から、われわれはDDSを考え、そのための材料、技術、方法論についての研究開発を進めている。例えば、全身あるいは局所粘膜ワクチン薬、および核磁気共鳴イメージング(MRI)、超音波診断薬などに対して、DDS技術を適用すれば、予防ワクチンおよび診断効果は高まる。また、化粧品、ヘルスケア成分へのDDS技術の適用は、それらの生物効果を高めることができる。このように、DDSとは、生物活性をもつ全ての物質に適用でき、普遍的な技術である。その適用によって、物質の生物作用を高めることができる薬物の可溶化、安定化、およびターゲティングなどのDDS技術、方法論についても研究を進めている。

4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

本研究分野は、高分子、金属、セラミックス、およびそれらの複合材料を医療に応用していくという、本研究所の前身である生体医療工学研究センターの材料科学研究の流れを引いている。その中で、生体内で吸収する性質をもつ高分子材料を中心として、外科・内科治療の補助のための生体材料の研究開発を行っている。

上記の研究内容について、材料科学的な観点から、基礎および応用研究を行っている。得られた研究成果を基に、様々な生体組織、臓器(皮膚、骨、心臓冠動脈、脂肪、軟骨、神経、歯周組織、毛髪、心筋、腎臓など)の再生誘導のメカニズムの解明、その臨床応用、あるいはDDS技術、方法論を用いた薬物治療、予防、診断などについて、医学部、歯学部、獣医学部、企業との共同研究を通じた、応用研究を展開している。加えて、得られた材料や技術の生物医学の基礎研究への応用についても共同研究を通して検討を進めている。

The main objective of our department is to investigate and develop methods, procedures, and technologies which are applicable to basic and clinical medicines as well as basic research of biology and medicine from the viewpoint of material sciences. The materials to use in the body and to contact biological substances, like proteins and cells, are defined as biomedical materials and biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials of polymers metals, ceramics, and their composites, are designed and created aiming at their clinical applications as well as the development of experimental tools necessary for basic researches of medicine and biology which scientifically support clinical medicine. We are investigating biomaterials to assist reconstructive surgery and to apply to drug delivery systems (DDS) for the biomaterials-based improvement of therapeutic efficacy. However, it is often difficult for patients to improve their Quality of Life (QOL) only by the therapeutic procedure of reconstructive surgery because the biomaterials applied are of poor biocompatibility and functional substitution. For organ transplantation, there are several problems to be resolved, such as the lack of donor tissue and organ or the adverse effects of immunosuppressive agents. The two advanced medical therapies currently available are clinically limited in terms of the therapeutic procedure and potential. In these circumstances, a new therapeutic trial, in which disease healing can be achieved based on the natural healing potential of patients themselves, has been explored. This is termed the therapy of regenerative medicine, where the regeneration of tissues and organs is naturally induced to therapeutically treat diseases by artificially promoting the proliferation and differentiation of cells. The objective of regenerative therapy is to regenerate injured or lost tissues and substitute organ functions by making use of cells. The regenerative medical therapy is quite different from the reconstructive surgery and organ transplantation from the viewpoint that neither biomaterials and medical devices nor immunosuppressive agents are needed. The basic idea of regenerative therapy is to give cells a local environment which is suitable to promote their proliferation and differentiation, resulting in the cell-based induction of tissue and organ regeneration. It is tissue engineering that is a biomedical technology or methodology to create this environment for the natural induction of tissue regeneration. Generally, there are three factors necessary to induce tissue regeneration, such as cells, the scaffold for cell proliferation and differentiation, and biosignaling molecules of growth factors and the related gene, which are fundamentally 3 components constituting the body tissue. For successful regenerative therapy of tissue and organ, it is indispensable to efficiently combine various biomaterials with all the body components. Among biomaterials, biodegradable biomaterials play an important role in this medical applications. Since there are few metals and ceramics with biodegradable nature, polymer materials of biodegrad-

ability have been mainly used for this purpose. If a biomaterial is degraded to disappear in the body, it is not always necessary to retrieve the material from the body after the function expected is accomplished. In addition, the material should be degraded at the right time profile not to allow to physically impair the natural process of tissue regeneration by the material remaining. Thus, biodegradable biomaterials are indispensable for the research and development (R&D) of regenerative medical therapy, DDS or basic biology and medicine.

Our research goal is to design and create biomaterials mainly from polymers which are practically applicable for regenerative medical therapy, stem cell technology, DDS, and medical therapy of reconstructive surgery and internal medicine. More detailed explanation about every project is described.

1) Biomaterials for the Therapy of Regenerative Medicine

It is well recognized that cells are present in the living tissue interacting with the extracellular matrix (ECM) of natural scaffold for the proliferation and differentiation of cells or their morphogenesis. When the body tissue is largely lost, the ECM itself also disappears. In such a case, only by supplying cells to the defect, we cannot always expect the tissue regeneration at the large defect. One of the possible ways to achieve successful tissue regeneration is to provide a temporary scaffold for the proliferation and differentiation of cells to the defect. We are designing and creating 3-dimensional and porous constructs of biodegradability as this temporary cell scaffold which is an artificial ECM. However, even if a superior scaffold is supplied to the tissue defect, the tissue regeneration will not be achieved without the number of cells and the amount of biosignaling molecules large enough for cell proliferation. It is one of the practically possible ways to make use of growth factors for promoted proliferation and differentiation of cells. It is, however, necessary for in vivo use of growth factors to contrive their administration form because of the in vivo short half-life and instability. One possible way to break through the problem is to use the controlled release of growth factor or the related gene at the tissue site to be regenerated over an extended time period by incorporating the factor or gene into an appropriate carrier. This release technology enables the growth factor to efficiently exert the biological activity, resulting in promoted tissue regeneration. We are designing and preparing the biodegradable carrier of growth factors and genes from gelatin and its derivatives. A new therapy to naturally induce tissue and organ regeneration by the controlled release of various biologically active growth factors has been achieved and scientifically demonstrated through animal experiments. Among the tissue regeneration trials, clinical experiments of angiogenic and bone regeneration therapies have been started by the controlled release technology of basic fibroblast growth factor (bFGF) and the good therapeutic efficacy is demonstrated.

Generally, in the chronic fibrotic disease, such as dilated cardiomyopathy, liver cirrhosis, lung fibrosis, and chronic nephritis, the damaged portion of organ is often occupied with the fibrous tissue, which often causes organ dysfunction. It is highly possible that if the fibrosis is enzymatically digested by a proper way, the fibrotic site is naturally regenerated and repaired on the basis of the inherent regenerative potential of the surrounding normal tissue and consequently the organ function is regenerated and recovered. We are designing and preparing a system of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity to achieve the regeneration therapy for chronic disease based on the natural healing potential of patients. Based on the drug administration therapy which has been clinically used in internal medicine, this is called as physical regenerative therapy of internal medicine. This is a therapeutic approach different from the conventional regenerative therapy of surgery where cells,

the scaffold, and signal molecules or the combinations are surgically applied to a tissue defect for regeneration induction thereat. The two surgical and physical regenerative therapies are conceptually identical from the viewpoint of the positive use of natural healing potential. In addition, the basic idea of regenerative therapy will be combined with interal medical therapy to open a new therapeutic field in the future. For example, the combination with aneurysm catheter therapy has been tried, and consequently the aneurysm occlusion by the regenerated tissue-based organization has been succeeded by the bFGF release system. On the other hand, a new cell culture technology is being developed to enhance the cellular expression level of nucleic acid compounds, such as decoy DNA and small interfering RNA (siRNA), with non-viral gene carriers.

2) Biomaterials for Stem Cells Technology and Basic Researches of Medicine and Biology

There are two approaches to realize regeneration medical therapy. One is the tissue engineering-based therapeutic approach described above. The other is cell transplantation therapy to induce tissue regeneration. For the latter approach, it is of prime importance to efficiently obtain and prepare cells with a high potential of proliferation and differentiation, such as stem cells, precursors, and blastic cells. In this department, the technology and methodology of cell culture with various biomaterials and bioreactors have been explored to efficiently isolate, proliferate, and differentiate stem cells, precursors, and blastic cells. A series of this study not only aims at the preparation of cells suitable for the therapy of regenerative medicine, but also research and development (R&D) of materials, technologies, and methodologies for basic medicine and biology. They are also applicable for the research of drugs development to evaluate their metabolism and toxicity. In addition, non-viral vectors for plasmid DNA and siRNA have been investigated to design the DDS system for gene transfection which can biologically analyze the functions of stem cells and genetically engineer cells to activate the biological functions for cell therapy. For example, we have developed a new system for the controlled release of plasmid DNA inside cells and succeeded in enhancing the level of gene transfection and the consequent gene expression as high as or higher than that of viral vector system. In addition, a new technology of cell culturing on plasmid DNA-coated substrates with or without the combination of bioreactor systems has been developed and enhanced the level of gene expression as well as prolonged the expressed period. This reverse transfection system (SubFection : substrate-mediated transfection) is effective in the gene transfection for stem and matured cells which have not been readily transfected by the conventional method while it can be applied for cell internalization of low-molecular weight compounds, peptides, proteins, and nucleic acids (siRNA and decoy DNA). We have enhanced the biological activities of plasmid DNA and siRNA with the non-viral vectors for stem cells and could modify their biological functions and differentiation.

3) Biomaterials for DDS

Generally there are few drugs which have a specific selectivity for the site of action. Therefore, the high-dose administration of drugs is necessary to achieve their in vivo therapeutic efficacy, while this often causes the adverse effects of drugs. DDS is an engineering trial which allows a drug to act at the right time the right site of action at the necessary concentration. The objective of DDS includes the controlled release of drug, the prolongation of drug life-time, the acceleration of drug permeation and absorption, and the drug targeting. Various biomaterials are inevitably required to achieve every DDS objective. In this department, various research projects of DDS for

drug and gene therapies are carried out from the viewpoint of polymer material sciences. Our definition of “drug” is not limited only to therapeutic substances, but it means every substance with a certain biological activity and function. The DDS technology and methodology can be also applied for preventive and diagnostic substances to enhance the in vivo efficacy of vaccination and diagnosis, such as magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound diagnosis or molecular imaging. We are also developing DDS technology and methodology which are applicable to the research and development of cosmetics and health care sciences. DDS is defined as an universal technology and methodology to efficiently enhance the biological functions of a certain substance by the combination with biomaterials and can universally apply to any research field of which the final goal is to enhance the biological functions of substances used.

4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

This department is partly originated from the division of Molecular Design and Biomaterials of the former Research Center for Biomedical Engineering where the medical applications of polymer materials have been investigated extensively. Among the research activities, we continue to molecularly design and create biomaterials mainly from biodegradable polymers aiming at the development of assistant materials in surgical and physical therapies.

From the viewpoint of biomaterial sciences, we are actively proceeding comprehensive biological and medical researches on the scaffold for the cell proliferation and differentiation, the DDS of growth factors and the related genes, and the material-based technology or methodology to use stem, precursor, and blast cells and in addition, their medical applications. Through several R&D collaborations with medical, dental, and veterinary schools as well as private companies, we are planning to apply our basic research results to realize the regeneration induction therapy of various tissues and organs, such as the skin, fat, bone, cartilage, nerve, hair, blood vessels, periodontium, myocardium, and kidney as well as the DDS technologies for therapeutic, prophylactic, and diagnostic medicines, while some biomaterials are applicable for basic of medicine and biology as the research tools.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Inoue, S., Iida, Y., Otani, Y., Hirano, Y., Tabata, Y.: Adhesion behavior of human adipo-stromal cells on self-assembled monolayers with different surface densities or gradients RGD peptide. *J Biomate Sci.* **20** : 495-510 (2009)
- Inoue, S., Imamura, M., Tabata, Y.: Adipogenic differentiation of adipo-stromal cells incubated with basic fibroblast growth factor in the solution and coated form. *J Biomate Sci* **20** : 483-494 (2009)
- Inoue, S., Imamura, M., Hirano, Y., Tabata, Y.: Adhesion and proliferation of human adipo-stromal cells for two- or three dimensional poly(ethylene terephthalate) substrates with or without RGD immobilization. *J Biomate Sci.* **20** : 721-736 (2009)
- Nagane, K., Kitada, M., Wakao, S., Dezawa, M., Tabata, Y.: Practical induction system for dopamine-producing cells

- from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A*. **15**(7): 1655-65(2009)
- Thakor, D.K., Teng, Y.D., Tabata, Y.: Neuronal gene delivery by negatively charged pullulan-spermine/DNA anionplexes. *Biomaterials*. **30**(9): 1815-26(2009)
- Takaoka, R., Hikasa, Y., Tabata, Y.: Vascularization Around Poly(tetrafluoroethylene) Mesh with Coating of Gelatin Hydrogel Incorporating Basic Fibroblast Growth Factor. *J Biomater Sci Polym Ed*. **20**: 1483-94(2009)
- Akagawa, Y., Kubo, T., Katsunori, K., Hayashi, K., Doi, K., Matsuura, A., Morita, K., Takeshita, R., Yuan, Q., Tabata, Y.: Initial bone regeneration around fenestrated implants in Beagle dogs using basic fibroblast growth factor-gelatin hydrogel complex with varying biodegradation rates. *J Prosthodont Res*. **53**(1): 41-47(2009)
- Kodama, N., Nagata, M., Tabata, Y., Ozeki, M., Ninomiya, T., Takagi, R.: A local bone anabolic effect of rhFGF2-impregnated gelatin hydrogel by promoting cell proliferation and coordinating osteoblastic differentiation. *Bone*. **44**(4): 699-707(2009)
- Lin, X., Tammbara, K., Fu, M., Yamamoto, M., Premaratne, G., Sakakibara, Y., Marui, A., Ikeda, T., Komeda, M., Tabata, Y.: Controlled Release of Matrix Metalloproteinase 1 with or without Skeletal Myoblasts Transplantation Improves Cardiac Function of Rat Hearts with Chronic Myocardial Infarction. *Tissue Eng Part A*. **15**(9): 2699-706(2009)
- Kimura, Y., Inamoto, T., Tabata, Y.: Regeneration of preadipocyte-induced adipose tissue by collagen scaffolds with different biodegradabilities. *J Biomater Sci Polym Ed*. in press
- Kimura, Y., Miyazaki, N., Hayashi, N., Otsuru, S., Tamai, K., Kaneda, Y., Tabata, Y.: Controlled release of bone morphogenetic protein-2 enhances recruitment of osteogenic progenitor cells for *de novo* generation of bone tissue. *Tissue Eng*. in press
- Kimura, Y., Inamoto, T., Tabata, Y.: Adipose Tissue Formation in Collagen Scaffolds with Different Biodegradabilities. *Journal of Biomaterials Science*. in press
- Jo, J., Okazaki, A., Nagane, K., Yamamoto, M., and Tabata, Y.: Preparation of cationized polysaccharides as gene transfection carrier for bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed*. **21**(2): 185-204(2010)
- Jo, J., Nagane, K., Yamamoto, M., and Tabata, Y.: Effect of amine type on the expression of plasmid DNA by cationized dextran. *J Biomater Sci Polym Ed*. **21**(2): 225-36(2010).
- Jo, J., Aoki, I., and Tabata, Y.: Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells. *J Control Release*. in press.
- Liu, J. and Tabata, Y.: Photodynamic antitumor activity of fullerene modified by polyethylene glycol with different molecular weights and terminal structures. *J Biomater Sci Polym Ed*. in press
- Lin, X., Tabata, Y.: Control-released Matrix Metalloproteinase-1 Prevents Left Ventricular Remodeling in Chronic Myocardial Infarction in Rats. *The Journal of Clinical Investigation*. in press
- Lin, X., Tammbara, K., Fu, M., Yamamoto, M., Premaratne, G., Sakakibara, Y., Marui, A., Ikeda, T., Komeda, M., Tabata, Y.: Matrix Metalloproteinase 1 Enhances the Graft Development of Transplanted Skeletal Myoblasts in Rat Hearts with Chronic Myocardial Infarction. *Tissue Eng*. in press
- Yoshida, M., Jo, J., and Tabata, Y.: Augmented anti-tumor effect of dendritic cells genetically engineered by

- interleukin-12 plasmid DNA. *J Biomater Sci Polym Ed.* in press
- Ogawa, T., Akazawa, T., Tabata, Y.: In vitro proliferation and chondrogenic differentiation of rat bone marrow stem cells cultured with gelatin hydrogel microspheres for TGF- β 1. *J Biomater Sci Polym Ed.* in press
- Tsuji, W., Inamoto, T., Yamashiro, H., Ueno, T., Kato, H., Kimura, Y., Tabata, Y., Toi, M.: Adipogenesis Induced by Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A*. **15**(1): 83-93(2009)
- Park, H., Temenoff, J. S., Tabata, Y., Caplan, A.L., Raphael, R.M., Jansen, J. A., Mikos, A. G.: Effect of dual growth factor delivery on chondrogenic differentiation of rabbit marrow mesenchymal stem cells encapsulated in injectable hydrogel composites. *J Biomed Mater Res A*. **88**(4): 889-897(2009)
- Park, H., Guo, X., Temenoff, J. S., Tabata, Y., Caplan, A. I., Kasper, F. K., Mikos, A. G.: Effect of Swelling Ratio of Injectable Hydrogel Composites on Chondrogenic Differentiation of Encapsulated Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *Biomacromolecules*. **10**(3): 541-546(2009)
- 田畑泰彦, 高藤義正, 吉田雅貴, 城 潤一郎: 金属配位結合を利用した薬の高分子修飾. *日本化学繊維研究所講演集*. **66**: 95-102(2009)
- 田畑泰彦: 神経ペプチドが幹細胞動員を高め創傷治癒を促す. *実験医学*. **27**(11): 1730-31(2009)
- 永井浩己, 西山耕一郎, 田畑泰彦, 岡本牧人: 塩基性繊維芽細胞増殖因子(b-FGF)を用いた自家筋膜移植の組織学的検討 - ラットの下肢筋を用いて -. *日気食会報*. **60**(1): 28-34(2009)
- 永井浩己, 西山耕一郎, 木村 祐, 田畑泰彦, 岡本牧人: ラットにおける一側性反回神経麻痺に対する塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)を用いた自家筋膜移植の効果. *日本気管食道科学会会報*. **60**(5): 424-432(2009)
- Guo, X., Park, H., Liu, G., Liu, W., Cao, Y., Tabata, Y., Kasper, F. K., Mikos, A.G.: In vitro generation of an osteochondral construct using injectable hydrogel composites encapsulating rabbit marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. **30**(14): 2741-52(2009)
- Zhao, Q.Q., Chen, J.L., Lv, T.F., He, C.X., Tang, G.P., Liang, W.Q., Tabata, Y., Gao, J.Q.: N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex. *Biol Pharm Bull*. **32**(4): 706-10(2009)
- Narita, A., Takahara, M., Ogino, T., Fukushima, S., Kimura, Y., Tabata, Y.: Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model. *Knee*. **16**(4): 285-89(2009)
- 成田 淳, 高原政利, 佐藤大祐, 荻野利彦, 福島重宣, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルと線維芽細胞増殖因子を用いた半月板修復. *日本整形外科スポーツ医学会雑誌*. **29**(3): 119-127(2009)
- Hashimoto, T., Koyama, H., Miyata, T., Hosaka, A., Tabata, Y., Takato, T., Nagawa, H.: Selective and Sustained Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor(bFGF) for Treatment of Peripheral Arterial Disease: Results of a Phase I Trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. **38**(1): 71-5(2009)
- 岡崎和一, 深田憲将, 大宮美香, 内田一茂, 松下光伸, 仲瀬裕志, 千葉勉, 田畑泰彦: ドラッグデリバリーシステムの将来展望とは? 分子消化器病. **6**(2): 151-55(2009)
- Katsuno, A., Aimoto, T., Uchida, E., Tabata, Y., Miyamoto, M., Tajiri, T.: The controlled release of basic fibroblast growth factor promotes a rapid healing of pancreaticojejunal anastomosis with potent angiogenesis and accelerates apoptosis in granulation tissue. *J Surg Res.* in press
- Hyoudou, K., Nishikawa, M., Ikemura, M., Kobayashi, Y., Mendelsohn, A., Miyazaki, N., Tabata, Y., Yamashita, F., Hashida, M.: Prevention of pulmonary metastasis from subcutaneous tumors by binary system-based sus-

- tained delivery of catalase. *J Control Release*. **137**(2): 110-5(2009)
- 新宅博文, 中川隆之, 川野聡恭, 田畑泰彦, 和田 仁, 伊藤壽一: MENS 技術による人工内耳の開発. ヘルスケ
アとバイオ医療のための先端デバイス機器. 326-35(2009)
- Li, L., Okada, H., Takemura, G., Esaki, M., Kobayashi, H., Kanamori, H., Kawamura, I., Maruyama, R., Fujiwara, T.,
Fujiwara, H., Tabata, Y., Minatoguchi, S.: Sustained release of erythropoietin using biodegradable gelatin
hydrogel microspheres persistently improves lower leg ischemia. *J Am Coll Cardiol*. **53**(25): 2378-88(2009)
- Zhong, H., Matsui, O., Xu, K., Ogi, T., Sanada, J., Okamoto, Y., Tabata, Y., Takuwa, Y.: Gene transduction into aortic
wall using plasmid-loaded cationized gelatin hydrogel-coated polyester stent-graft. *J Vasc Surg*. **50**(6): 1433-
43(2009)
- Ishimatsu, H., Kitamura, C., Morotomi, T., Tabata, Y., Nishibara, T., Chen, K.K., Terashita, M.: Formation of Denti-
nal Bridge on Surface of Regenerated Dental Pulp in Dentin Defects by Controlled Release of Fibroblast
Growth Factor-2 From Gelatin Hydrogels. *J Endod*. **35**(6): 858-65(2009)
- Inuyama, Y., Kitamura, C., Nishihara, T., Morotomi, T., Nagayoshi, M., Tabata, Y., Matsuo, K., Chen, K.-K., Terashita,
M.: Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J*
Biomed Mater Res B Appl Biomater. (2009)
- Ohta, S., Nitta, N., Sonoda, A., Seko, A., Tanaka, T., Takahashi, M., Kimura, Y., Tabata, Y., Murata, K.: Cisplatin-
conjugated degradable gelatin microspheres: fundamental study in vitro. *Br J Radiol*. **82**(977): 380-5(2009)
- Sonoda, A., Nitta, N., Ohta, S., Nitta-Seko, A., Murata, S., Jo, J., Tabata, Y., Takahashi, M., Tani, T., Murata, K.: Inves-
tigation using an HER-2/neu transgenic mouse model of a newly developed MR contrast agent with the ef-
fect of an antitumor drug. *J Magn Reson Imaging*. **30**(40): 907-10(2009)
- Seko, A., Nitta, N., Sonoda, A., Ohta, S., Takahashi, M., Murata, K., Tabata, Y.: Vascular regeneration by repeated
infusions of basic fibroblast growth factor in a rabbit model of hind limb ischemia. *American Journal of*
Roentgenology. **192**(6): 306-10(2009)
- Nitta, N., Ohta, S., Tanaka, T., Takazakura, R., Toyama, T., Sonoda, A., Seko, A., Furukawa, A., Takahashi, M., Mu-
rata, K., Kurumi, Y., Tani, T., Sakamoto, T., Tabata, Y.: An initial clinical study on the efficacy of cisplatin-
releasing gelatin microspheres for metastatic liver tumors. *Eur J Radiol*. **71**(3): 519-26(2009)
- 伊藤和雄, 田畑泰彦, 茂野啓示: 座談会 デンティンボンディングを再評価する. 歯界展望. **114**(4): 672-96(2009)
- Komeda, M., Marui, A., Tambara, K., Yamamoto, M., Saji, Y., Nishina, T., Tabata, Y.: Biologic anastomosis: The first
case of biologic coronary bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **138**(3): 775-77(2009)
- Young, S., Patel, Z.S., Kretlow, J.D., Murphy, M.B., Mountziaris, P.M., Baggett, L.S., Ueda, H., Tabata, Y., Jansen, J.A.,
Wong, M., Mikos, A.G.: Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morpho-
genetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Eng: Part A*, **15**(9): 2347-62
(2009)
- Takemoto, Y., Kawata, H., Soeda, T., Imagawa, K., Somekawa, S., Takeda, Y., Uemura, S., Matsumoto, M., Fujimura,
Y., Jo, J., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y.: Human Placental Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydro-
lase Gene Transfer via Gelatin-Coated Stents Prevents In-Stent Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
29(6): 857-62(2009)
- 米田正始, 田畑泰彦: 第2章 生体シグナル因子の利用 1. 細胞増殖因子 2) 下肢血管: bFGF 徐放血管新生治

- 療. 遺伝子医学 MOOK 13 号 患者までとどいている再生誘導治療: 92-95(2009)
- 米田正始, 田畑泰彦: 第 2 章 生体シグナル因子の利用 1. 細胞増殖因子 6) 心臓冠状動脈. 遺伝子医学 MOOK 13 号 患者までとどいている再生誘導治療: 112-15(2009)
- 楠原廣久, 磯貝典孝, 田畑泰彦: 第 2 章 生体シグナル因子の利用 1. 細胞増殖因子 13) 指尖部切断再接着への応用. 遺伝子医学 MOOK 13 号 患者までとどいている再生誘導治療: 144-49(2009)
- 宮本正章, 高木 元, 太良修平, 水野博司, 田畑泰彦, 水野杏一: 第 4 章 組み合わせ 1. 足場と細胞増殖因子 1) 皮膚真皮: 皮膚真皮の再生誘導治療. 遺伝子医学 MOOK 13 号 患者までとどいている再生誘導治療: 232-36(2009)
- 永井浩巳, 西山耕一郎, 木村 祐, 田畑泰彦, 岡本牧人: ラットにおける一側性反回神経麻痺に対する塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)を用いた自家筋膜移植術の効果. J Jpn Bronchoesophagol Soc, **60**(5): 424-32(2009)
- 高木岳彦, 石井 賢, 木村 祐, 芝田晋介, 斎藤治和, 岡野 James 洋尚, 田畑泰彦, 岡野榮之, 戸山芳昭, 中村雅也: 末梢神経損傷に対する bFGF 徐放化人工神経の有用性~自家神経と比較して~. in press
- He, C.X., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Non-viral gene delivery carrier and its three dimensional transfection system. Int J Pharm, **386**(1-2): 232-42(2010)
- 山内由隆, 松野智宣, 小俣和彦, 田畑泰彦, 佐藤田鶴子: 新たな骨補填材への期待. 歯学. **97**(秋季特集号): 72-75(2009)
- 松野智宣, 小俣和彦, 足立雅利, 高森等, 田畑泰彦, 代居 敬, 住友雅人, 佐藤田鶴子: 細胞増殖因子を局所徐放する骨誘導再生複合材の臨床応用. 歯学. **97**(秋季特集号): 90-94(2009)
- Matsumoto, G., Omi, Y., Kubota, E., Ozono, S., Tsuzuki, H., Kinoshita, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Enhanced Regeneration of Critical Bone Defects Using a Biodegradable Gelatin Sponge and β -Tricalcium Phosphate with Bone Morphogenetic Protein-2. J Biomater Appl. **24**(4): 327-42(2009)
- 松井倫子, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲルを用いた動物個体への核酸導入. 実験医学. **27**(19): 3151-56(2009)
- 田村悦代, 福田宏之, 田畑泰彦, 岡田信也, 渋谷正人, 飯田正弘: 塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた声帯内脂肪注入術-臨床応用の試み- 日気食会報. **60**(6): 476-482(2009)
- Takaoka, M., Nagata, D., Kihara, S., Shimomura, I., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y., Nagai, R., Sata, M.: Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. Circ Res. **105**(9): 906-11(2009)
- Egusa, H., Kaneda, Y., Akashi, Y., Hamada, Y., Matsumoto, T., Saeki, M., Thakor, DK., Tabata, Y., Matsuura, N., Yatani, H.: Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts. Biomaterials. **30**(27): 4676-86(2009)
- Asamura, S., Mochizuki, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y., Isogai, N.: Bone regeneration using a BMP-2-saturated slow-release gelatin hydrogel sheet: evaluation in a canine orbital floor fracture model. Annals of Plastic Surgery. in press
- Inaoka, T., Nakagawa, T., Kikkawa, YS., Tabata, Y., Ono, K., Yoshida, M., Tsubouchi, H., Ido, A., Ito, J.: Local application of hepatocyte growth factor using gelatin hydrogels attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. Acta Otolaryngol. **129**(4): 453-7(2009)
- Kabashima, K., Sakabe, J., Yoshiki, R., Tabata, Y., Kohno, K., Tokura, Y.: Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. Am J Pathol, **176**(2): 721-32(2010)
- Komobuchi, H., Hato, N., Teraoka, M., Wakisaka, H., Takahashi, H., Gyo, K., Tabata, Y., Yamamoto, M.: Basic fibro-

- blast growth factor combined with biodegradable hydrogel promotes healing of facial nerve after compression injury : an experimental study. *Acta Otolaryngol.* 13 : 1-6 (2009)
- Nishikawa, T., Nakagami, H., Maeda, A., Morishita, R., Miyazaki, N., Ogawa, T., Tabata, Y., Kikuchi, Y., Hayashi, H., Tatsu, Y., Yumoto, N., Tamai, K., Tomono, K., and Kaneda, Y. : Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J Cell Mol Medicine.* 3 : 535-546 (2009)
- 柴田達也, 島田明美, 出野 尚, 荒木香映子, 石川万里子, 只木麻友, 田畑泰彦, 二藤 彰 : 頭蓋骨欠損モデルを用いた安全な骨再生法の探究. *鶴見歯学.* **135**(2): 122 (2009)
- Ichinohe, N., Nakano, T., Mitaka, T., Umakoshi, Y. and Tabata, Y. : Proliferation and osteogenic differentiation of rat bone-marrow stromal cells on bio-apatite with different crystalline facets. *J Biomed Mater Res, Part A.* in press
- Yamamoto, M., James, D., Li, H., Butler, J., Rafii, S. and Rabbany, Y. S. : Generation of Stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold. *Tissue Eng Part A.* **16**(1) : 299-308 (2010)
- Rabbany, Y. S., Pastore, J., Yamamoto, M., Miller, T., Rafii, S., Aras, R., and Penn, M. : Continuous delivery of stromal cell-derived factor-1 from alginate scaffolds accelerates wound healing. *Cell Transplant.* in press
- Tazaki, J., Murata, M., Akazawa, T., Yamamoto, M., Ito, K., Arisue, M., Shibata, T., and Tabata, Y. : BMP-2 release and dose-response studies in hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *Biomed Mater Eng.* **19** : 141-146 (2009)
- Lin, X., Tammbara, K., Fu, M., Yamamoto, M., Premaratne, G. U., Sakakibara, Y., Marui, A., Ikeda, T., Komeda, M., and Tabata, Y. : Controlled release of matrix metalloproteinase 1 with or without skeletal myoblasts transplantation improves cardiac function of rat hearts with chronic myocardial infarction. *Tissue Eng Part A.* **15** : 2699-2706 (2009)
- Lin, X., Jo, H., Ishii, T. M., Fujita, M., Fu, M., Tambara, K., Yamamoto, M., Tabata, Y., Komeda, M., and Matsuoka, S. : Controlled release of matrix metalloproteinase-1 plasmid DNA prevents left ventricular remodeling in chronic myocardial infarction of rats. *Circ J.* **73** : 2315-21 (2009)
- Igai, H., Chang, S. S., Gotoh, M., Yamamoto, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y., and Yokomise, H. : Widespread and early tracheal cartilage regeneration by synchronous slow release of b-FGF and BMP-2. *ASAIO J.* **55** : 266-270 (2009)
- Sonoda, A., Nitta, N., Ohta, S., Nitta-Seko, A., Morikawa, S., Tabata, Y., Takahashi, M., Murata, K. : Controlled Release and Antitumor Effect of Pluronic F127 Mixed with Cisplatin in a Rabbit Model. *Cardiovasc Intervent Radiol.* **33**(1): 135-42 (2010)
- Kawanaa, H., Takagi, G., Miyamoto, M., Tara, S., Takagi, I., Takano, H., Yasutake, M., Tabata, Y., Mizuno, K. : Therapeutic angiogenesis by controlled-release fibroblast growth factor in a patient with Churg-Strauss syndrome complicated by an intractable ischemic leg ulcer. *Am J Med Sci.* **338**(4): 341-2 (2009)

2) 著 書

- 山本雅哉, 田畑泰彦 : 第1章細胞周辺環境のための材料化学技術 4. 複合材料. 遺伝子医学 MOOK 別冊ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術 : 71-76 (2009)
- 山本雅哉, 田畑泰彦 : 第2章 細胞周辺環境のための材料加工・利用技術 15. 傾斜機能化技術. 遺伝子医学 MOOK

別冊ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術：169-74(2009)

山本雅哉, 田畑泰彦：第4章 細胞周辺環境のための生物医学・工学融合化学技術 2. 生体シグナル因子徐放化.
遺伝子医学 MOOK 別冊ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術：283-90(2009)

木村 祐, 田畑泰彦：第1章 細胞周辺環境のための材料化学技術 1. 高分子 3)天然高分子(タンパク質). 遺
伝子医学 MOOK 別冊ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術：50-54(2009)

城 潤一郎, 田畑泰彦：第4章 細胞周辺環境のための生物医学・工学融合化学技術 4. 細胞の遺伝子改変. 遺
伝子医学 MOOK 別冊ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術：296-300(2009)

3) 総 説

Tabata, Y.: Biomaterial technology for tissue engineering applications. J. R. Soc.Interface. **6**: 311-324(2009)

田畑泰彦：再生医療におけるドラッグデリバリーシステム(DDS)の重要性. Fragrance Journal. **37**(1): 42-49(2009)

田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生誘導治療. 人工臓器. **38**(1):8-11(2009)

田畑泰彦：生体シグナル因子と細胞足場による細胞移植. 医学のあゆみ. **229**(9):740-747(2009)

田畑泰彦：再生医療における Tissue Engineering の役割. CIRCULATION Up-to-Date, **4**(4):70-78(2009)

田畑泰彦：生体材料学(バイオマテリアル). 炎症・再生医学事典：554-559(2009)

田畑泰彦：細胞周辺環境の重要性－序論にかえて. 遺伝子医学 MOOK 別冊ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術：31-33(2009)

田畑泰彦：炎症という観点からみた「再生医療」. 炎症・再生. **29**(5), (2009)

Jo, J., Tabata, Y.: Gene delivery system based on cationized polysaccharide carriers. Soft Nanomaterials: 319-28
(2009)

田畑泰彦：患者まで届いている再生誘導治療. 遺伝子医学 MOOK 13号 患者までとどいている再生誘導治療：27-
29(2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Kimura, Y., Tabata, Y. : Controlled release of stromal cell-derived factor-1(SDF-1) to promote cell-based angiogenesis. The 9th World Congress on Inflammation 2009(WCI2009) (2009.07.06-10 Tokyo, Japan)

Kimura, Y., Tsuji, W., Yamashiro, H., Toi, M., Inamoto, T., Tabata, Y. : *In Situ* adipose tissue regeneration augmented by collagen scaffold combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. The 2nd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-WC2009) (2009.08.31-09.03 Seoul, Korea)

Jo, J., Nagane, K., Kido, Y., and Tabata, Y. : Modification of cells differentiation direction by small interfering RNA complexed with cationized polysaccharide. Biomaterials in Asia (2009.4.5-8 Hong Kong)

城 潤一郎, 折口智哉, 平野義明, 田畑泰彦：炎症イメージング材料としてのアネキシン V の有用性. 第4回日本分子イメージング学会学術集会(2008.5.14-15 東京)

城 潤一郎, 山本雅哉, 田畑泰彦：核酸物質の細胞内導入のための多糖ナノ複合体の開発と幹細胞の生物機能改変. 第2回融合ナノ基盤若手研究者交流会(2008.6.23 京都)

- Jo, J., Nagane, K., Kido, Y., and Tabata, Y. : Small interfering RNA complexed with cationized polysaccharide modifies differentiation direction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. 2nd Asia Biomaterial Congress (2009.6.26-27 Singapore)
- 城 潤一郎, 吉田雅貴, 田畑泰彦: リバーストランスフェクション法による IL-12 遺伝子改変樹状細胞の作製とその抗がん効果の増強. 第 25 回日本 DDS 学会(2009.7.3-4 東京)
- Jo, J., Lin, X., Aoki, I., and Tabata, Y. : Design and preparation of magnetic resonance imaging contrast agent for angiogenic therapy. The 9th World Congress on Inflammation(2009.7.6-10 Tokyo)
- Jo, J., Lin, X., Aoki, I., and Tabata, Y. : Design and preparation of magnetic resonance imaging contrast agent for therapeutic angiogenesis. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress Meeting 2009(2009.8.31-9.3 Seoul)
- Jo, J., Okasora, T., Yoshida, M., Nagane, K., Dezawa, M., and Tabata, Y. : A reverse transfection technology to genetically engineer cells and the application to transplantation therapy. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress Meeting 2009(2009.8.31-9.3 Seoul)
- 城 潤一郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: 非ウイルス性キャリアを用いた幹細胞への核酸物質導入とその分化制御. 骨・カルシウム代謝研究会(2009.9.11 京都)
- 城 潤一郎, 田畑泰彦: サイズおよび表面電位の異なる酸化鉄ナノ粒子を用いた幹細胞ラベリング. 第 58 回高分子討論会(2008.9.16-18 熊本)
- 城 潤一郎, 林 雪, 青木伊知男, 田畑泰彦: 血管新生治療過程イメージングのための磁気共鳴イメージング造影剤の作製. 第 31 回日本バイオマテリアル学会(2008.11.16-17 京都)
- 劉 健, 山本雅哉, 田畑泰彦: 骨再生評価のための骨イメージング剤の作製. 第 36 回骨カルシウム代謝研究会. (2009.2.13 京都)
- 劉 健, 山本雅哉, 田畑泰彦: 骨再生評価のための多機能性高分子イメージング剤の作製. 第 25 回日本 DDS 学会. (2009.7.3-4 東京)
- 劉 健, 山本雅哉, 田畑泰彦: 多機能性高分子イメージング剤の作製と機能評価. 第 38 回医用高分子シンポジウム. (2009.7.27-28 東京)
- 小原洋志, 山本雅哉, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルを用いた神経ペプチドの徐放による血管新生誘導. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- Kohara, H. and Tabata, Y. : Angiogenesis induced by controlled release of neuropeptide. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium/Retreat2009(2009.11.6-8 淡路島)
- Kohara, H. and Tabata, Y. : The controlled release of neuropeptides induces angiogenesis. The 10th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems.(2009.12.16-20 Lahaina)
- Uesugi, Y., Jo, J., and Tabata, Y. : An ultrasound-responsive delivery system of thrombolytic drug. 2009 The 10th US-Japan Symposium on Drug Delivery System.(2009.12.16-20 Maui)
- 根来宏光, 今村正明, 兼松明弘, 金谷 勲, 山崎俊成, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: bFGF による平滑筋 gap junction 発現を介した過活動膀胱発症機序の解明. 第 96 回日本泌尿器科学会総会(2009.4.16-19 岡山)
- 浅野一成, 小俣和彦, 松野智宣, 佐藤田鶴子, 田畑泰彦: 骨再生誘導バイオマテリアルとしての bFGF 徐放化 β -TCP/ゼラチン複合体. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 木戸祐一郎, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 生体吸収性の三次元細胞培養基材を利用した幹細胞への遺伝子導入. 第 8 回

- 日本再生医療学会総会(2009.3.5-6 東京)
- 木戸祐一郎, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 生体吸収性の三次元細胞足場内の幹細胞への新規遺伝子導入法の開発. 第 25 回日本 DDS 学会(2009.7.3-4 東京)
- 木戸祐一郎, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 生体吸収性の三次元細胞足場内での組織幹細胞の培養と遺伝子導入. 日本バイオマテリアル学会第 4 回関西若手研究発表会(2009.8.7 大阪)
- 木戸祐一郎, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 生体吸収性の三次元細胞足場を利用した組織幹細胞の遺伝子改変. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 木戸祐一郎, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 組織幹細胞の遺伝子改変のための生体吸収性三次元細胞足場の作製. 2009KIPS 若手高分子シンポジウム(2009.12.11 京都)
- 林 健太郎, 田畑泰彦: 骨髓由来幹細胞と生体吸収性微粒子からなる細胞凝集体の作製. 第 8 回日本再生医療学会総会(2009.3.5-6 東京)
- 林 健太郎, 田畑泰彦: 生体吸収性ゼラチン粒子を利用した骨髓間葉系幹細胞凝集体の作製. 日本バイオマテリアル学会第 4 回関西若手研究発表会(2009.8.7 大阪)
- 林 健太郎, 田畑泰彦: 組織幹細胞と生体吸収性ゼラチン粒子からなる細胞凝集体の作製. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 村上裕子, 山本雅哉, 田畑泰彦: 貯蔵弾性率の異なる基材上での上皮細胞の培養. 第 8 回日本再生医療学会総会(2009.3.5-6 東京)
- 村上裕子, 山本雅哉, 田畑泰彦: 貯蔵弾性率の異なるポリアクリルアミドハイドロゲル上での細胞挙動. 日本バイオマテリアル学会第 4 回関西若手研究発表会(2009.8.7 大阪)
- 村上裕子, 山本雅哉, 田畑泰彦: 貯蔵弾性率の異なるハイドロゲル上での上皮細胞の培養. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 大野由尊, 山本雅哉, 田畑泰彦: 塩基性線維芽細胞増殖因子グラジエント化アルギン酸-コラーゲン複合スポンジ内における間葉系幹細胞の培養. 日本再生医療学会(2009.03.05-06 東京)
- 大野由尊, 山本雅哉, 田畑泰彦: 塩基性線維芽細胞増殖因子グラジエント化アルギン酸スポンジ内での間葉系幹細胞の培養. 日本バイオマテリアル学会 第 4 回関西若手研究会(2009.08.07 大阪)
- 大野由尊, 山本雅哉, 田畑泰彦: 塩基性線維芽細胞増殖因子グラジエント化アルギン酸スポンジ内での間葉系幹細胞の骨・軟骨分化培養. 第 31 回日本バイオマテリアル学会(2009.11.16-17 京都)
- 大野由尊, 山本雅哉, 田畑泰彦: 成長因子グラジエント化 RGDS ペプチド導入アルギン酸スポンジ内での骨分化培養. KIPS 高分子若手シンポジウム(2009.12.11 京都)
- 田島脩平, 木戸祐一郎, 田畑泰彦: 細胞内遺伝子導入のためのカチオン化ゼラチン/プラスミド DNA 複合体の作製. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 白井智明, 高藤義正, 城 潤一郎, 田畑泰彦: small interfering RNA 導入のためのカチオン化ゼラチンの合成. 第 55 回高分子研究発表会(2009.7.17 神戸)
- 白井智明, 城 潤一郎, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを利用した siRNA のがん組織ターゲティング. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: Fc ドメインをもつキメラタンパク質固定化のための基材作製. 第 55 回高分子研究発表会(2009.7.17 神戸)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: Jagged1 固定化基材表面での造血幹細胞の培養. 第 31 回日本バイオマテリアル

学会(2009.11.16-17 京都)

Watanabe, M., Jo, J., Tabata, Y., Flake, A. W.: A Tissue Engineering Approach for Prenatal Closure of Myelomeningocele. 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World congress Meeting 2009(2009.8.31-9.3 Seoul)

Watanabe, M., Jo, J., Tabata, Y., Flake, A. W.: A Tissue Engineering Approach for Prenatal Closure of Myelomeningocele. American College of Surgeons 95th annual clinical congress(2009.10.11-15 Chicago)

Sawamura, K., Ikeda, T., Nagae, M., Mikami, Y., Hase, H., Okamoto, S., Ikoma, K., Yamada, T., Saito, M., Matsuda, K., Sakamoto, H., Tabata, Y., Kawata, M., Kubo, T.: Mechanisms of regenerative effects of platelet-rich plasma on the degenerated intervertebral disc in vivo. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. (2009.2.22-25 Las Vegas)

澤村和秀, 池田 巧, 長江将輝, 三上靖夫, 長谷 斉, 岡本慎一, 生駒和也, 山田哲也, 田畑泰彦, 河田光博, 久保俊一: Drug delivery system を応用した多血小板血漿の家兎変性椎間板内投与による変性抑制機序の検討. 第38回日本脊椎脊髄病学会(2009.4.23-25 兵庫)

澤村和秀, 池田 巧, 長江将輝, 三上靖夫, 長谷 斉, 岡本慎一, 生駒和也, 山田哲也, 田畑泰彦, 河田光博, 久保俊一: 多血小板血漿を用いた椎間板再生に関する MRI・組織細胞化学研究. 第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会(2009.9.27 滋賀)

岡本慎一, 池田 巧, 澤村和秀, 長江将輝, 三上靖夫, 長谷 斉, 本城邦晃, 田畑泰彦, 河田光博, 久保俊一: 変性椎間板に対する多血小板血漿のアポトーシス抑制効果と血小板含有成長因子の徐放動態の解析. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会(2009.11.5-6 横浜)

田所美香, 木村 祐, 田畑泰彦, 大串 始: BMP-2 徐放性ゼラチン- β TCP スポンジ材料を用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞の骨分化. 第31回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)

Narita, A., Takahara, M., Sato, D., Ogino, T., Fukushima, S., Kimura, Y., Tabata, Y.: Meniscal repair using biodegradable gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2: Experimental study in rabbits. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society(2009.2. 22-25 Las Vegas)

Narita, A., Takahara, M., Sato, D., Ogino, T., Fukushima, S., Kimura, Y., Tabata, Y.: Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society(2009.2. 22-25 Las Vegas)

成田 淳, 高原政利, 佐藤大祐, 荻野利彦, 福島重宣, 木村 祐, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルと線維芽細胞増殖因子を用いた半月板修復. 第8回日本再生医療学会総会(2009.3.5-6 東京)

成田 淳, 高原政利, 伊藤和生, 佐藤大祐, 荻野利彦, 福島重宣, 木村 祐, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルと線維芽細胞増殖因子を用いた家兎半月板修復. 第1回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(2009.6.25-27 北海道)

Tsuiji, W., Inamoto, T., Yamashiro, H., Kato, H., Ueno, T., Kimura, Y., Tabata, Y., Toi, M.: Adipose tissue engineering for breast reconstruction after surgery. MD Anderson Cancer Center and Kyoto Univ. Grad. School of Medicine International Symposium 2009(2009.3.22 Kyoto)

高木岳彦, 石井 賢, 木村 祐, 芝田晋介, 斎藤治和, 岡野 James 洋尚, 田畑泰彦, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 末梢神経損傷に対する bFGF 徐放化人工神経の有用性～自家神経と比較して～. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会(2009.11.5-6 横浜)

- 北川偉之, 松原千恵, 宇山 浩, 田畑泰彦: ドライスピニング法を用いたポリペプチドファイバーからなる三次元構造体の作製と応用. 第 58 回高分子討論会(2009.09.16-18 熊本)
- 松田貴之, 北川偉之, 美濃貴之, 宇山 浩, 田畑泰彦: 細胞足場材料を志向したポリペプチドファイバーの開発. 第 58 回高分子討論会(2009.09.16-18 熊本)
- 北川偉之, 松原千恵, 宇山 浩, 田畑泰彦: ドライスピニング法を用いたポリペプチドファイバーからなる三次元構造体の作製と応用. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 戸部 賢, 小幡英章, 田畑泰彦, 斎藤 繁: 徐放化局所麻酔薬による術後痛の制御. 第 31 回日本疼痛学会(2009.7.17-18 名古屋)
- Kawamura, I., Takemura, G., Kanamori, H., Li, L., Esaki, M., Kobayashi, H., Tsujimoto, A., Maruyama, R., Fujiwara, T., Fujiwara, H., Tabata, Y., Minatoguchi, S.: Sustained Release of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Using Biodegradable Gelatin Hydrogel Improves Limb Ischemia. 第 73 回日本循環器学会学術集会(2009.3.20-22 大阪)
- Kawamura, I., Takemura, G., Kanamori, H., Li, L., Tsujimoto, A., Ushikoshi, H., Fujiwara, T., Fujiwara, H., Tabata, Y., Minatoguchi, S.: Sustained Release of Granulocyte colony-stimulating factor using biodegradable gelatin hydrogel improves limb ischemia. 2009 Congress of the European Society of Cardiology(2009.8.29-9.2 Barcelona, Spain)
- Kawamura, I., Takemura, G., Kanamori, H., Li, L., Okada, H., Esaki, M., Kobayashi, H., Tsujimoto, A., Goto, K., Maruyama, R., Takeyama, T., Kawaguchi, T., Watanabe, T., Hattori, A., Ushikoshi, H., Aoyama, T., Kawasaki, M., Nishigaki, K., Fujiwara, H., Tabata, Y., Minatoguchi, S.: Sustained Release of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Using Biodegradable Gelatin Hydrogel Microspheres Persistently Improves Blood Flow of Ischemic Limbs in Mice. 2009 Meeting of the American Heart Association(2009.11.14-17 Orlando, FL, USA)
- 川村一太, 竹村元三, 金森寛充, 李 龍虎, 江崎正泰, 小林浩之, 辻本晃子, 丸山留美, 藤原兌子, 藤原久義, 田畑泰彦, 湊口信也: 生体吸収性ゼラチン粒子からの G-CSF 徐放による虚血下肢治療. 第 9 回心血管再生先端治療フォーラム(2009.7.4 東京)
- 永井浩巳, 西山耕一郎, 清野由輩, 木村 祐, 田畑泰彦, 岡本牧人: ラットの一側性声帯麻痺による甲状披裂筋の萎縮に対する b-FGF を用いた筋膜移植術の効果. 第 61 回日本気管食道科学会総会(2009.11.5-6 横浜)
- 坂本雄二, 小泉範子, 奥村直毅, 高橋浩昭, 平田香葉, 山本真弓, 塚原ゆり, 磯部俊恵, 田畑泰彦, 木下 茂.: bFGF 含浸ゼラチンマイクロスフィアの前房内投与による角膜内皮創傷治療効果の検討. 第 33 回角膜カンファランス・第 25 回角膜移植学会(2009.2.19-21 大阪)
- 小畑陽子, 古巣 朗, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂: Hepatocyte growth factor(HGF)遺伝子導入マクロファージを用いた腹膜線維化抑制効果の検討. 第 3 回長崎障害者支援再生医療研究会(2009.7.7 長崎)
- 柴田達也, 島田明美, 出野 尚, 田畑泰彦, 二藤 彰: 生体吸収性材料と BMP-2 プラスミド DNA の組合せによる頭蓋骨欠損修復の試み. 第 8 回日本再生医療学会総会(2009.3.5-6 東京)
- 柴田達也, 島田明美, 出野 尚, 田畑泰彦, 二藤 彰: 骨再生を目的としたプラスミド DNA による in vivo 遺伝子導入のためのキャリアーの検討. 第 27 回日本骨代謝学会学術集会(2009.7.23-25 大阪)
- Milena, S., Martinez, P., Imai, H., Okano-Uchida, T., Kurachi, M., Ishizaki, Y., Tabata, Y., Yoshimoto, Y.: A trial for axonal regeneration by using bFGF continuous delivery system in the rat brain. 第 52 回日本神経化学会大

会(2009.6.22-24 群馬)

Milena, S., Martinez, P., Imai, H., Okano-Uchida, T., Kurachi, M., Ishizaki, Y., Tabata, Y., Yoshimoto, Y.: A trial for axonal regeneration by using bFGF continuous delivery system in the rat brain. GRT 研究会第 24 回学術集会(2009.6.21 群馬)

Milena, S., Martinez, P., Imai, H., Okano-Uchida, T., Kurachi, M., Ishizaki, Y., Tabata, Y., Yoshimoto, Y.: bFGF gelatin microspheres as a continuous delivery system for axonal regeneration in rat stroke model. 第 21 回日本脳循環代謝学会総会(2009.11.19-20 大阪)

Yamamoto, M., Hayashi, N., and Tabata, Y.: A Spatial Gradient of RGD Peptide in a Three-dimensional Scaffold Directs Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. Biomaterials Asia 2009(2009.4.5-8 Hong Kong, China)

Singh, S. P., Yamamoto, M., Rafii, D. C., Sung, J., Henderson, P. W., Rabbany, S. Y., Spector, J. A.: In vivo evaluation of a novel drug delivery vehicle in a murine wound model. The Symposium on Advanced Wound Care and Wound Healing Society 2009 Spring(2009.4.26-29 Dallas, USA)

Yamamoto, M., Hayashi, N., and Tabata, Y.: Cell Adhesion Peptide Gradient in a Three-dimensional Scaffold Directs Spatial Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. 2nd Asian Biomaterials Congress(2009.6.26-27 Singapore)

Yamamoto, M. and Tabata, Y.: A novel therapeutic concept of tissue engineering to induce tissue regeneration for chronic fibrosis. TERMIS 2nd World Congress(2009.8.31-9.3 Seoul, Korea)

Yamamoto, M., Hayashi, N., and Tabata, Y.: A Three-dimensional Spatial Gradient of Cell Adhesion Peptide in Alginate Scaffolds Directs Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. TERMIS 2nd World Congress(2009.8.31-9.3 Seoul, Korea)

Yamamoto, M., Hokugo, A., Takahashi, Y., and Tabata, Y.: A Novel Scaffold Combined with Controlled Release of Bone Morphogenetic Protein Enhances Stem Cell-Based Bone Regeneration after Radiation Therapy in Rabbits. TERMIS 2nd World Congress(2009.8.31-9.3 Seoul, Korea)

山本雅哉, 田畑泰彦: 生理活性物質の 3 次元グラジエント化足場材料による間葉系幹細胞の骨分化の空間的制御. 第 58 回高分子討論会(2009.9.16-18 熊本)

Yamamoto, M., Hayashi, N., and Tabata, Y.: Osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells in alginate scaffolds with a three-dimensional spatial gradient of cell adhesion peptide. 10th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems(2009.12.16-20 Maui, USA)

大澤昌之, 古川洋志, 白井智明, 城 潤一郎, 田畑泰彦, 山本有平: 近赤外蛍光標識ヒアルロン酸誘導体の物性に関する検討: リンパ向性ドラッグデリバリーシステムの開発第 3 報. 第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会(2009.10.1-2 東京)

大澤昌之, 古川洋志, 白井智明, 城 潤一郎, 田畑泰彦, 山本有平: リンパ系イメージング剤としての近赤外蛍光標識ヒアルロン酸誘導体の開発. 第 21 回北海道 MMC 研究会(2009.11.28 札幌)

古村 眞, 古村浩子, 大谷祐之, 石丸哲也, 田中裕次郎, 小高哲郎, 杉山正彦, 金森 豊, 星 和人, 田畑泰彦, 岩中 督: 軟骨再生の新規足場としてのゼラチンと β -TCP 複合体による有用性の検討. 第 8 回日本再生医療学会総会(2009.3.5-6 東京)

Komura, M., Komura, H., Ohtani, Y., Ishimaru, T., Tanaka, Y., Kodaka, T., Sugiyama, M., Kanamori, Y., Hoshi, K.,

Tabata, Y., and Iwanaka, T.: The Utility of biodegradable gelatin sponges incorporating b-tricalcium phosphate for engineered cartilage scaffold. 2nd TERMIS World Congress. (2009.8.31-9.3 Seoul)

Takagi, G., Miyamoto, M., Kawanaka, H., Tabata, Y., Mizuno, K.: Novel approach for most difficult case due to vasculitis complicated with infected ulcer. CCT2009. (2009.1.29 神戸)

若尾昌平, 林 拓也, 高本智紹, 小濱みさき, 北田容章, 田畑泰彦, 出澤真理: カニクイザル骨髄間葉系細胞からのシュワン細胞誘導と末梢神経損傷への自己細胞移植. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2009.3.28-30 岡山)

2) 講演・シンポジウム

田畑泰彦: 再生医療・再生誘導治療の現状と今後の展望について. 第一三共株式会社講演会 (2009.1.19 東京)

田畑泰彦: 先端医療を拓くバイオマテリアル・DDS 技術. 千里ライフサイエンス新適塾 (2009.1.26 豊中)

Tabata, Y.: Regeneration medicine based on biomaterials technology of cell scaffold and drug delivery system (DDS). Kyoto University Global COE program Center for the 1st Frontier Medicine Retreat. (2009.1.31 長浜)

Tabata, Y.: Frontier of regeneration therapy with tissue engineering technology of growth factor and gene. 1st Alexandria International Congress on Tissue Engineering (2009.2.15-16 Alexandria, Egypt)

田畑泰彦: ここまで進んだ再生医療 - 耳鼻咽喉科領域での展開を含めて -. 愛媛県 ENT 臨床セミナー (2009.2.21 松山)

田畑泰彦: 幹細胞機能改変のための核酸の細胞内導入材料・技術. 医工学フォーラム - 2008 年度特別学術講演会 - (2009.2.25 京都)

田畑泰彦: 先端医療と基礎生物医学研究を支えるバイオマテリアル技術. 住友ベークライト株式会社講演会 (2009.3.4 東京)

田畑泰彦: 再生医療と幹細胞生物医学研究のためのバイオマテリアル・DDS 技術. 第 4 回 DDS 熊本シンポジウム (2009.3.16 熊本)

田畑泰彦: Cardiovascular Regeneration Therapy Based on DDS Technology. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 (2009.3.20 大阪)

Tabata, Y.: Delivery technology of bio-signaling molecules for tissue regeneration. Biomaterials Asia 2009 (2009.4.5-9 Hong Kong)

田畑泰彦: 先端医療と生物医学研究に必要なバイオマテリアル技術. 名古屋大学大学院工学研究科講演会 (2009.4.15 名古屋)

Tabata, Y.: Biomaterial Technology of Drug Delivery for Regeneration Medicine. 第 36 回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 (2009.4.20 岡山)

田畑泰彦: バイオマテリアル技術からみた再生誘導治療と幹細胞生物医学. 第 8 回再生心臓血管外科治療研究会 (2009.4.22 富山)

田畑泰彦: バイオマテリアルからみた再生誘導治療と幹細胞生物学. 長崎腎再生医療研究会 (2009.5.7 長崎)

田畑泰彦: 先端医療を支えるバイオマテリアル (生体材料) と DDS の最前線. 2009 年度東京大学ナノバイオ工学講義 (2009.5.14 東京)

Tabata, Y.: Important contribution of biomaterials technology to tissue regeneration therapy. FBPS2009

(2009.5.20-23 三島)

田畑泰彦：バイオマテリアルと医用材料. 東京工業大学大学院理工学研究科応用化学専攻講義(2009.5.27 東京)

田畑泰彦：バイオマテリアルを利用した再生誘導治療. 東京工業大学大学院理工学研究科応用化学専攻講義
(2009.5.27 東京)

田畑泰彦：再生医療技術の最前線. 味の素株式会社講演会(2009.6.4 東京)

田畑泰彦：バイオマテリアル技術からみた先端医療. 分子イメージング科学研究センターセミナー(2009.6.8 神戸)

田畑泰彦：生体シグナル因子とドラッグデリバリーシステム. 日本歯科大学講義(2009.6.10 東京)

田畑泰彦：バイオマテリアル技術を利用した再生医療の最前線. 日本高気圧環境・潜水医学会関東地方会第9回学
術集会(2009.6.13 前橋)

田畑泰彦：生物医学・医療のための高分子材料. 第44回「高分子の基礎と応用講座」(2009.6.19 大阪)

田畑泰彦：再生誘導治療と生物医学研究を支える DDS 技術. 第46回薬剤学懇談会研究討論会(2009.6.26 神戸)

Tabata, Y: Biomaterial Technology for Regeneration Therapy and Stem Cell Biology. Second Asian Biomaterials
Congress(2009.6.27 Singapore)

Tabata, Y.: Advanced Biomaterials Technology and Regenerative Therapy. ICMAT2009(2009.6.29 Singapore)

Tabata, Y: Bone regeneration induced by biodegradable gelatin hydrogels incorporating simvastatin of water in-
solubility. The 9th World Congress on Inflammation(2009.7.8 東京)

Tabata, Y: Tissue Engineering: Kyoto Perspective. Workshop on Tissue Engineering(2009.7.15 Jogjakarta, In-
donesia)

Tabata, Y: Biosignaling Molecules and Stem Cell Biology. Workshop on Tissue Engineering(2009.7.15 Jogjakarta,
Indonesia)

Tabata, Y: Controlled release of water-insoluble simvastatin from biodegradable gelatin hydrogels for bone regen-
eration. 36th Annual Meeting and Exposition of CRS(2009.7.19-20 Copenhagen, Denmark)

Tabata, Y: A novel gene trasfection method to genetically engineer dendritic cells for anti-tumor activation. 36th
Annual Meeting and Exposition of CRS(2009.7.19-20 Copenhagen, Denmark)

Tabata, Y: Delivery technology of biosignaling molecules for regeneration therapy of future medicine. NIMS
WEEK 2009(2009.7.23 つくば)

田畑泰彦：京都再生医療産業化ネットワークの取り組み. 平成21年度 京都工業会 R&D 問題懇話会(2009.7.30
京都)

田畑泰彦：先端医療を具現化するバイオマテリアル技術. 第29期新工業材料ゼミナール(第11回)(2009.8.12 京都)

Tabata, Y: Strategies for Tissue Regeneration and Vascularization Based on Release Technology of Growth Fac-
tor. Advances in Tissue Engineering(2009.8.15 Houston, USA)

Tabata, Y: Biomaterial Technology of Growth Factor Release Realizes Regenerative Medicine Therapy. 2nd TER-
MIS World Congress(2009.8.31 Seoul, Korea)

Tabata, Y: Release Technology of Cell Recrutable Molecules to Induce In Situ Tissue Regeneration. 2nd TERMIS
World Congress(2009.9.2 Seoul, Korea)

田畑泰彦：再生医療からバイオイメージングまで支える DDS 技術. 第18回日本バイオイメージング学会学術集
会(2009.9.4 岡山)

Tabata, Y: Biomaterial Technology of Tissue Engineering to Realize Tissue Regeneration Therapy. ICOS-2009

(2009.9.6 Kottayam, India)

Tabata, Y.: Biomaterial Technology for Tissue Regeneration Therapy and Stem Cell Biology. 6th IBN Seminar (2009.9.8 Singapore)

田畑泰彦：再生医療の現状と将来. ニチバン株式会社技術講演会(2009.9.11 福岡)

田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生誘導治療と幹細胞生物医学研究. 日本再生歯科医学会第7回学術大会および総会(2009.9.12 福岡)

田畑泰彦：バイオマテリアルの最前線とその実用化 - 医薬医療と材料との接点 -. 帝人株式会社講演会(2009.9.15 大阪)

田畑泰彦：再生誘導治療 ～バイオマテリアル, 生体シグナル因子, 細胞を利用した再生医療の現状～. 味の素株式会社医薬カンパニー医薬研究所講演会(2009.9.28 川崎)

Tabata, Y.: Frontier Technology of Tissue Engineering Indispensable to Realize Regeneration Therapy of Cardiovascular Field. Taipei Veterans General Hospital(2009.10.1 Taipei, Taiwan)

Tabata, Y.: Significant Role of Biomaterial-Based Tissue Engineering in Regeneration Therapy and Stem Cell Biology. National Yang-Ming University(2009.10.1 Taipei, Taiwan)

田畑泰彦：再生誘導治療と幹細胞生物医学研究に必要なバイオマテリアル技術. 医薬基盤研究所セミナー(2009.10.2 大阪)

田畑泰彦：バイオマテリアルから見た再生誘導治療. 第113回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会(2009.10.3 神戸)

Tabata, Y.: Delivery Technology of Growth Factor in Bone Tissue Engineering. bone-tec 2009(2009.10.9 Hannover, Germany)

田畑泰彦：再生誘導治療に必要な不可欠なバイオマテリアル技術. 第42回日本薬剤師会学術大会(2009.10.11 大津)

田畑泰彦：ここまで進んでいる再生医療. 平成21年度公民館講座「芦屋川カレッジ」(2009.10.14 芦屋)

田畑泰彦：バイオマテリアル技術を活用した再生医療. ピエールフォーシャルアカデミー日本部会(2009.10.31 京都)

田畑泰彦：バイオマテリアルからみた先端医療. 京都大学医学研究科大学院教育コース「医工学連携コース」講義(2009.11.11 京都)

Tabata, Y.: How to Be Scientifically Productive and Laboratory. Gadjah Mada University Workshop(2009.11.18-20 Yogyakarta, Indonesia)

田畑泰彦：低分子薬物の徐放化を目指した生体吸収性ハイドロゲルのデザインと調製. 第67回財団法人日本化学繊維研究所講演会(2009.11.20 京都)

田畑泰彦：医工連携の大きな可能性-再生医療分野で活かすものづくり技術. (社)京都工業会 平成21年度 第4回ウエルネス研究科 ウエルネス産業人材育成セミナー(2009.11.24 京都)

田畑泰彦：再生誘導治療(再生医療)を実現するマテリアル技術. 京都リサーチパーク株式会社 再生医療の全体像を見わたせるわかりやすい解説講座(2009.11.26 京都)

田畑泰彦：DDS技術からみた再生医療と幹細胞生物医学研究. 第15回先端医療談話会(2009.12.1 東京)

田畑泰彦：再生誘導治療と幹細胞生物医学研究に必要な不可欠なバイオマテリアル技術. 株式会社林原生物化学研究所講演会(2009.12.4 岡山)

田畑泰彦：再生医療と幹細胞生物医学研究を支えるDDS技術. 第3回NEDO特別講座DDSシンポジウム「次世代DDSが切り拓く未来医療」(2009.12.12 東京)

山本雅哉, 田畑泰彦: 生体シグナル因子を組み込んだバイオマテリアルによる3次元組織構築. 第8回日本再生医療学会(2009.3.5-6 東京)

山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞増殖因子を組み込んだ機能性バイオマテリアルによる再生誘導治療. 第18回硬組織再生生物学会(2009.9.5 札幌)

Yamamoto, M., Jo, J., Liu, J., and Tabata, Y.: Significance of drug delivery systems in enhanced molecular imaging for regenerated tissues. "The 1st Hokkaido University - Academia Sinica Joint Symposium" and "The 7th Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care"(2009.9.5 札幌)

Yamamoto, M. and Tabata, Y.: Osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells in alginate scaffolds with a three-dimensional spatial gradient of biomolecules. "Kyoto University Global COE program Center for Frontier Medicine Retreat 2009"(2009.11.6-8 淡路島)

Yamamoto, M. and Tabata, Y.: A novel therapeutic concept of tissue engineering to induce tissue regeneration for chronic fibrosis. "First International Conference Regenerative Surgery"(2009.12.9-11 Rome, Italy)

組織修復材料学分野 Department of Reporative Materials

分野主任 教授 岩田 博夫

Prof. Hiroo Iwata

【研究概要】

当研究分野では、病気や怪我の治療に役立つ人工材料を創り出すための研究を行っています。それらの材料は人体の中で機能したり、体外での細胞操作・分析に効力を発揮するなど、その目的と機能は様々です。当研究分野では主に、高分子を中心とする有機材料、また、細胞や生体分子を制御・分析するための様々な技術を駆使することで、それらの研究を進めています。このような研究を通じて、再生医療や低侵襲手術のような高度先進医療に貢献したいと考えています。

1. 材料-生体システム間相互作用

医用材料は、細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面で起こる分子間相互作用を通して機能を発揮します。そのため、タンパク質吸着や細胞接着のような材料-生体システム間相互作用を詳細に理解し、また、それらを厳密に制御することは重要な課題です。当研究分野では、表面プラズモン共鳴分析装置、表面プラズモン励起蛍光分析装置、全反射顕微鏡などの光学的手法を用いてこれらの課題に取り組んでいます。また、これらの基礎研究の結果をもとに高感度バイオセンシング装置の開発を行っています。

2. 組織工学用材料

細胞移植による臓腑や中枢神経の再生医療に期待が寄せられています。しかし、移植された細胞の機能を高く維

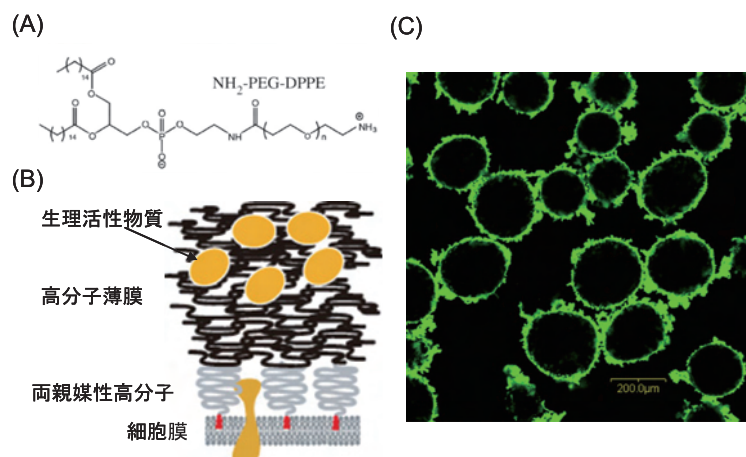


図 1. (A)末端にポリエチレングリコール鎖を有する脂質分子を設計した。この分子は細胞膜に親和性をもち(B), インスリン産生細胞からなる膵ランゲルハンス島の表面に高分子薄膜を形成させることが可能である(C)。

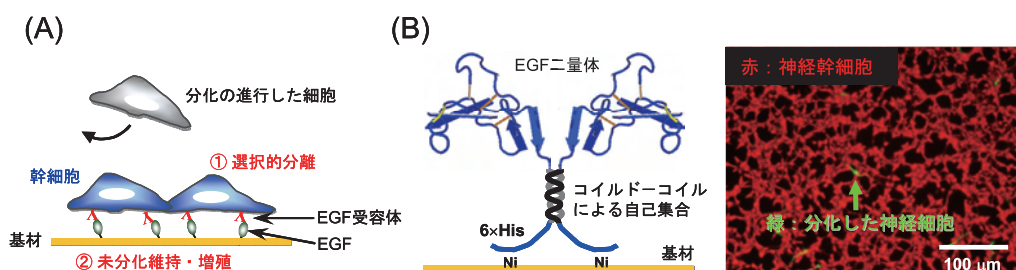


図 2. 神経幹細胞を大量に調製するための培養基材の設計. (A) 神経幹細胞を選択的に増殖するための戦略. (B) 自己二量化型 EGF の配向固定した基材上での神経幹細胞の選択的増殖.

持するには、細胞がレシピエントの免疫系からの攻撃に打ち勝たなければなりません。これには高分子ハイドロゲルによる細胞のカプセル化が有効です。当研究分野では、さらに優れた機能をもつカプセル化材料を生み出すため、材料化学的観点から研究を行っています(図 1)。また、移植細胞による損傷組織の修復には、様々なシグナル分子を必要とします。そこで、細胞の機能を高度に制御できるタンパク質性材料の創出を目的として、遺伝子組換え技術を利用した組織修復材料の設計に取り組んでいます。

3. 移植細胞プロセッシング技術

再生医療の実現にとって、移植用の細胞をどのように調製するかという問題は、もっとも重要な課題の一つです。当研究分野では、ドーパミン作動性神経細胞、インスリン産生細胞、造血幹細胞、神経前駆細胞などを、安全かつ高効率に作り出すための細胞分化制御・増幅技術の開発に取り組んでいます(図 2)。とくに、細胞外マトリックスや細胞増殖因子のような生体分子、あるいは、ストローマ細胞のような異種の細胞を利用して、細胞の分化・増殖に適した人工環境の創出を目指しています。

4. 細胞アレイ

多種類の生体分子の機能を迅速に分析するための細胞アレイの開発を行っています。マイクロパターンをもつ基板材料を利用して多種類の DNA、あるいは、RNA、タンパク質、生細胞など配列固定し、それらを同時に細胞に作用させることで、固定された分子の生物学的機能を並列分析することが可能です。また、細胞の形態や培養液の

循環を厳密に制御する技術と組み合わせ、新たなバイオアッセイ法へと展開する試みも行っています。細胞アレイ分析法は、生物学研究のみならず、再生医療、医薬品開発、臨床検査などの様々な分野に大きなインパクトを与えるものと期待されます。

Our research group intends to develop engineered materials that contribute practically and efficiently to the advanced therapeutic interventions for the treatment of diseases and traumatic injuries. These materials are expected to exhibit diverse functions in vitro or in vivo. Fundamental and applied studies are undertaken to realize such biomaterials, taking advantage of organic materials, namely polymeric materials and state-of-the-art techniques for analyzing and handling biomolecules and cells.

Research subjects currently undertaken in our department are listed below.

Surface chemistry of biomedical materials

Protein adsorption and complement activation are involved in the initial reactions against man-made materials with living bodies. It is necessary to elucidate these mechanisms in relation to the surface properties so as to rationally design biocompatible surfaces of synthetic implants. Most of information on protein adsorption and complement activation by artificial polymeric materials has been accumulated from studies with polymeric materials. However, polymer surfaces could not be assumed rigid and immobile at equilibrium. The polymer molecules in the vicinity of the surface or interface would exhibit motion and relaxation in response to the different interfacial environments. Thus, it is difficult to prepare model surfaces using polymeric materials for studies of the complement activation. Self-assembled monolayers of alkanethiols formed on a gold thin film provide well-defined model surfaces suitable for studies on interfacial phenomena and intermolecular interactions. The surface plasmon resonance technique can be applied to analyze the interfacial phenomena under water. We have been studying protein adsorption, complement activation, and cell adhesion on well-defined surfaces made of self-assembled monolayers using the surface plasmon resonance technique as well other analysis techniques highly sensitive for interfacial molecular events.

Polymeric materials for cell transplantation therapy

Islets of Langerhans have been transplanted to treat insulin-dependent diabetes patients. Adult pancreatic β cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing β cells from cadaver donors or animals should be employed. In bioartificial pancreas, islets are encapsulated into a semi-permeable membrane and then implanted into the diabetic patients to protect them from immune rejection. The semi-permeable membrane permits permeation of oxygen and nutrient which are necessary for islet survival, but prohibits contact of islet cells with components of the host immune system. We encapsulated islets into agarose-based microbeads and induced normalization of blood glucose levels of diabetic recipient mice by implanting 1000 microencapsulated hamster islets into the peritoneal cavity.

Several research groups showed that transplantation of neural stem cells (NSCs) or NSC-derived progenitors to the site of lesions was effective for structural and functional restoration of the central nervous system. However, clinical applications of NSCs further require methodological advances especially for controlling the engraftment,

proliferation, migration, and differentiation of NSCs. Our approach is to construct composite biomaterials that consist of extracellular matrix (ECM) components and signaling molecules such as growth factors and cell adhesion molecules. We are employing genetic engineering to rationally design such composite biomaterials.

Cell processing technology for regenerative medicine

Cells and ECMs are important components for regenerative medicine. In recent years, many research groups have devoted enormous efforts to establish *in vitro* culture conditions in which stem cells, such as ES cells and tissue-derived stem cells, differentiate into various functional cells. Those cells are expected to be very useful for treatment of various diseases. Many kinds of stromal cells have been used to differentiate stem cells to functional cells. However, most of stromal cells preferentially used are derived from mice. Some authorities who are in charge of regulatory issue have pointed out the difficulty to rule out the possibility that retrovirus incorporated in mouse gene will be activated and transferred to stem cells and functional cells derived from stem cells. One of our research activities is focused on the development of stromal cell free culture systems used for the induction of ES cells to various functional cells. ES cells cultured on the substrate, onto which bioactive molecules isolated from stromal cells, are immobilized effectively differentiated to dopaminergic neurons.

Conventional cell culture substrates are not always suitable for cells used for regenerative medicine. Neurons differentiated from ES cells *in vitro* are very difficult to be collected from a cell culture flask without deterioration of cell functions, because long axons from neurons are easily damaged during detachment of neural cells from the cell culture substrate. Cell sheets but not single cells are needed in some instance, such as regeneration of a skin and a mucous membrane. We have been examining a film of cellulose derivatives for a cell culture substrate. Cells cultured on it are removed by cellulose-degrading enzyme, cellulase, without damaging cells on the substrate.

Cell chips for high-throughput functional screening

Transfectional array : Functional characterization of human genes may be one of the most challengeable tasks in the post-genome era. Due to a huge number of novel genes discovered in genomics, high-throughput methods are required to express or silence in parallel thousands of genes in living cells. The objective of our study is to fabricate transfectional arrays through patterning of self-assembled monolayers on a gold substrate and the subsequent site-specific spotting of different expression vectors or short interfering RNAs.

Antibody array : Recent progress in stem cell research provides us with promising options of cell sources for use in tissue engineering. However, insufficient knowledge about specific surface antigens expressed on most of stem cells limits their application in regenerative medicine. To solve this problem, we developed a high-throughput analytical method for typing multiple membrane proteins. Our method is based on solid-phase cytometry using an antibody array prepared on a patterned alkanethiol monolayer.

ECM array : Arrays that display a panel of biologically-active substances on a flat plate are promising due to their potential use in functional screening over multiple samples in a parallel fashion. We developed cell-based arrays that displayed combinatorially various ECM-growth factor composites and used them for parallel and rapid screening biomaterials that serve to maintain NSCs and direct the differentiation of NSCs.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Arima Y, Kawagoe M, Toda M, Iwata H.: Complement activation by polymers carrying hydroxyl groups. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 2400-2407 (2009)
- Arima Y, Teramura Y, Takiguchi H, Kawano K, Kotera H, Iwata H.: Surface plasmon resonance and surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy for sensitive detection of tumor markers. *Methods Mol. Biol.* **503**, 3-20 (2009)
- Fujita S, Oshima M, Iwata H.: Time-lapse observation of cell alignment on nanogrooved patterns. *J. R. Soc. Interface* **6**(Suppl 3), S269-S277 (2009)
- Teramura Y, Iwata H.: Islets of Langerhans encapsulated with a layer of living cells for improvement of biocompatibility. *Biomaterials* **30**, 2270-2275 (2009)
- Teramura Y, Iwata H.: Surface modification of islets with PEG-lipid for improvement of graft survival in intraportal transplantation. *Transplantation* **88**, 624-630 (2009)
- Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H.: Hyaluronic acid hydrogel loaded with genetically-engineered brain-derived neurotrophic factor as a neural cell carrier. *Biomaterials* **30**, 4581-4589 (2009)
- Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H.: Surface-anchoring of spontaneously dimerized epidermal growth factor for highly selective expansion of neural stem cells. *Bioconjugate Chem.* **20**, 102-110 (2009)
- Hiraoka M, Kato K, Nakaji-Hirabayashi T, Iwata H.: Enhanced survival of neural cells embedded in hydrogels composed of collagen and laminin-derived cell adhesive peptide. *Bioconjugate Chem.* **20**, 976-983 (2009)
- Miyazaki H, Maki T, Kato K, Iwata H.: Surface-displayed antibodies as a tool for simultaneously controlling the arrangement and morphology of multiple cell types with microscale precision. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 53-55 (2009)
- Fujimoto H, Kato K, Iwata H.: Prolonged durability of electroporation microarrays as a result of addition of saccharides to nucleic acids. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 607-614 (2009)
- Agudelo C A, Teramura Y, Iwata H.: Cryopreserved agarose-encapsulated islets as bioartificial pancreas: a feasibility study. *Transplantation* **87**(1), 29-34 (2009)
- Nishigaki T, Yuji Teramura Y, Suemori H, Iwata H.: Efficient cryopreservation of human embryonic stem cells with chemically-defined solution without DMSO. *Cryobiology* in press
- Kuraishi K, Iwata H, Nakano S, Kubota S, Tonami H, Toda M, Toma N, Matsushima S, Ogawa S, Taki W.: Development of nano-fiber covered stents using electrospinning. -In vitro and acute phase in vivo experiments-. *J. Biomed. Mat. Res. Part B: Appl. Biomater.* **19**, 230-239 (2009)

2) 著書

- 松田晶二郎, 加藤功一: 再生医療と高分子材料, 「機能性繊維の最新技術」(白井汪芳監修, CMC 出版, 東京) 194-207 (2009)

3) 総 説

岩田博夫, 有馬祐介, 西垣達矢: アレイ法による幹細胞培養基材のスクリーニング, 再生医療, **8**, 78-83 (2009)

加藤功一, 岩田博夫: 蛋白質工学: 蛋白質工学を利用したバイオマテリアルの分子設計, 生体材料, **27**, 238-245 (2009)

寺村裕治, 岩田博夫: 進みつつける細胞移植治療の実際(上巻), 免疫隔離法 – バイオ人工臓臓を中心 –, 遺伝子医学 MOOK 別冊 241-246 (2008)

寺村裕治, 岩田博夫: バイオ人工臓臓, 膵 β 細胞の機能発揮に適した環境, 月間糖尿病, **1**, 77-86 (2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Iwata H.: Biointerface-analysis + design + application. Biomaterials Asia 2009 (2009.4. 5-8 Hong Kong)

Kato K, Nakaji-Hirabayashi T, Konagaya S, Iwata H.: Surface-anchoring of genetically-engineered growth factors onto substrates for their efficient presentation toward cells, 2nd International Symposium on Nanomedicine (ISNM2008) (2009.2.5-6 岡崎)

加藤功一, 岩田博夫: 神経幹細胞の分化制御に向けた細胞アレイ分析, 特定領域バイオ操作, 第7回公開シンポジウム (2009.3.6 仙台)

加藤功一, ユウジ・エジガール・エガワ, 平岡真希子, 中路 正, 岩田博夫: キメラ蛋白質を用いたコラーゲン-神経幹細胞界面のデザイン, 第58回高分子討論会 (2009.9.16-18 熊本)

寺村裕治, 岩田博夫: Islet-surface modification with PEG-conjugated lipid and graft survival, 第58回高分子年次大会 (2009.5.28 神戸)

寺村裕治, 岩田博夫: 両親媒性高分子を用いた細胞による膵ランゲルハンス島のカプセル化, 第58回高分子討論会 (2009.9.16-18 熊本)

Teramura Y, Iwata H.: Surface modification of islets with PEG-lipid for improvement of graft survival in intraportal transplantation”, IPITA-IXA 2009 Joint meeting (2009.10.14 ベニス)

Teramura Y, Takemoto, N, Iwata H.: Islets-encapsulation with living cells for improvement of biocompatibility”, IPITA-IXA 2009 Joint meeting (2009.10.15 ベニス)

寺村裕治, 岩田博夫: 細胞による膵ランゲルハンス島のカプセル化, 第47回日本人工臓器学会 (2009.11.13 新潟)

寺村裕治, 川本卓男, 岩田博夫: 細胞間相互作用を利用した膵ランゲルハンス島のカプセル化, 第31回日本バイオマテリアル学会 (2009.11.16-17 京都)

苗村祥太, 寺村裕治, 岩田博夫: Spheroid formation from heterogeneous cells by amphiphilic polymers, 第58回高分子年次大会 (2009.5.28 神戸)

藤田 聡, 岩田博夫: 細胞の自己組織化過程のモデル化, 第31回日本バイオマテリアル学会大会 (2009.11.16-17 京都)

有馬祐介, 川越雅子, 戸田満秋, 岩田博夫: ポリビニルアルコールによる補体活性化, 第134回ポータル会 (2009.7.4 京都)

有馬祐介, 岩田博夫: 各種官能基を有するモデル表面へのアルブミン/フィブロネクチン競争吸着および細胞接着, 第38回医用高分子シンポジウム (2009.7.27-28 東京)

- 有馬祐介, 岩田博夫: 表面官能基の異なる自己組織化単分子膜へのフィブロネクチン／アルブミン競争吸着および細胞接着. 第 58 回高分子討論会(2009.9.16-18 熊本)
- 有馬祐介, 川越雅子, 戸田満秋, 岩田博夫: ポリビニルアルコールによる補体活性化. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- Tonami H, Hamada K, Nakano S, Kubota S, Toma N, Matsushima S, Taki W, Toda M, Iwata H.: Development of nano-fiber covered stents using electrospinning. ISNM2009 & Asian Core Symposium -Nano and Biomedical Molecular Science(2009.2.5 Okazaki)
- Tonami H, Hamada K, Iwata H, Nakano S, Kubota S, Toda M, Toma N, Matsushima S, Ogawa, S, Taki W.: Fabrication and evaluation of electrospun polyurethane-covered stent for treatment of cerebral aneurysm. International Intracranial Stent Meeting(2009.8.5 Sendai)
- 外波弘之, 濱田和秀, 中野恵之, 窪田真一郎, 戸田満秋, 当麻直樹, 松島 聡, 滝 和郎, 岩田博夫: 脳血管内治療用カバードステントの作製と評価. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: ラミニン由来ポリペプチドを含む細胞接着性キメラタンパク質の設計, 第 38 回医用高分子シンポジウム(2009.7.27-28 東京)
- 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: ラミニン由来ポリペプチドを利用した基底膜様基材の創製, 第 58 回高分子討論会(2009.9.16-18 熊本)
- 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 移植神経幹細胞の生存率の向上にむけたラミニン由来ポリペプチド複合化基材の設計, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 陳 顥, 寺村裕治, 岩田博夫: PEG 脂質を用いた生理活性物質の臍島表面への固定. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- Egawa E. Y, Kato K, Hiraoka M, Nakaji-Hirabayashi T, Iwata H.: Utilization of genetically engineered epidermal growth factor to construct collagen-based hydrogel carrier for promoting neural stem cell proliferation, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 小長谷周平, 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 神経栄養因子のパラレル機能アッセイのための細胞チップ, 日本バイオマテリアル学会 第 4 回関西若手発表会(2009.8.7 大阪)
- 小長谷周平, 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 神経幹細胞の定方向分化環境のスクリーニング, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 西垣達矢, 寺村裕治, 岩田博夫: Cryopreservation of adherent cells on the substrates. 第 58 回高分子学会年次大会(2009.5.29 神戸)
- 西垣達矢, 寺村裕治, 岩田博夫: 人工多能性幹細胞の凍結保存液の検討, 日本バイオマテリアル学会第 4 回関西若手研究発表会(2009.8.7 大阪)
- 西垣達矢, 寺村裕治, 岩田博夫: 人工多能性幹細胞の凍結保存液の検討, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 山本寿弘, 寺村裕治, 岩田博夫: 平面脂質膜と両親媒性高分子の相互作用解析, 日本バイオマテリアル学会第 4 回関西若手研究発表会(2009.8.7 大阪)
- 山本寿弘, 寺村裕治, 岩田博夫: 平面脂質膜と両親媒性高分子の相互作用解析, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 山本英樹, 中路 正, 藤田 聡, 加藤功一, 岩田博夫: サル ES 細胞の神経細胞への分化誘導と EGF 固定化基板

における選択, 日本バイオマテリアル学会第4回関西若手研究発表会(2009.8.7 大阪)

山本英樹, 寺村裕治, 岩田博夫: 異種細胞間相互作用によるES細胞の三次元培養と分化制御, 第31回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)

村上隆史, 岩田博夫, 有馬祐介, 戸田満秋: 高分子薄膜による表面プラズモン場励起蛍光法におけるエネルギー移動の抑制, 第55回高分子研究発表会(2009.7.17 神戸)

竹本直紘, 寺村裕治, 岩田博夫: 表面修飾腓ランゲルハンス島による糖尿病治療の試み, 第7回積水化学自然に学ぶものづくりフォーラム(2009.10.21 京都)

2) 講演・シンポジウム

Iwata H.: Cell surface modification for regenerative medicine. NIMSWEEK09, Nanobio-materials and technologies for breakthrough in future medicine(2009.7.21-24 Tsukuba)(招待講演)

Iwata H.: Cells surface modification with a ultra thin membrane. 2009 International Workshop on Nano Biomedicine(2009.8.21 Taiwan)(招待講演)

岩田博夫: Biointerface-Analysis+Design+Application. グローバル COE リエゾンラボ研究会(2009.9.2 熊本)(招待講演)

岩田博夫: バイオインターフェイス-解析+設計+応用-. 化学工学会第41回秋季大会(2009.9.16 広島)(招待講演)

Iwata H.: Cell adhesion behavior on well defined surfaces. 3rd International Symposium on Nanomedicine – Molecular Imaging for System Biology – (2009.11.4-6 Okazaki)

加藤功一: 神経幹細胞機能制御のためのバイオインターフェース設計. 情報バイオトロニクス研究会(2009.6.19 仙台)

加藤功一, 中路 正, 小長谷周平, 岩田博夫: 表面提示のための機能性ポリペプチドの分子設計. 第31回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)

寺村裕治, 山本英樹, 川本卓男, 岩田博夫: 細胞間相互作用の解析を可能とする細胞の表面修飾. 第31回日本バイオマテリアル学会(2009.11.16-17 京都)

Arima Y.: Effect of surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using self-assembled monolayers. ISNM2009 & Asian Core Symposium(2009.2.4-6 岡崎)(招待講演)

生体物性学分野 (国内客員) Department of Mechanical Properties

客員准教授 平井 洋平
Visiting Assoc. Prof. Yohei Hirai

【研究概要】

高等生物の諸器官の構築過程には, 多種多様の細胞外シグナル分子群が参加しそれぞれが時間的・空間的な活性

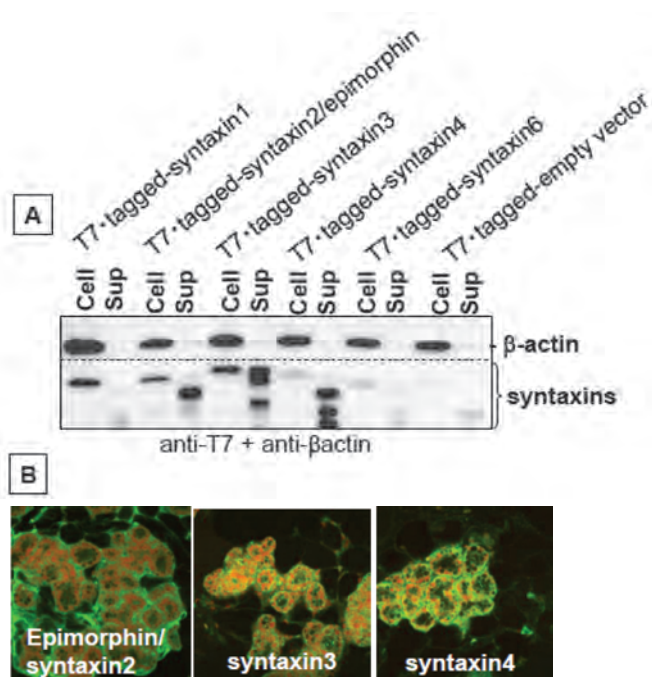


図 1. t-SNARE 分子群の分泌と乳腺組織での発現

- (A) T7 ペプチドタグを付加した syntaxin1~6 の発現ベクターを乳腺上皮細胞に導入し、免疫沈降により、細胞 (Cell) ならびに培地に分泌された (Sup) 遺伝子産物を回収して解析した。Syntaxin2 (=epimorphin), 3,4 が sup に検出され分泌されていることがわかる (Sup には β -actin が検出されず細胞画分の持込は無視できる)。
- (B) 乳腺組織での Syntaxin2 (=epimorphin), 3,4 の発現分布。Epimorphin は間質細胞で発現しているのに対し, syntaxin3,4 は主に上皮細胞で検出される。

発現調節を受けて組織形態・機能分化の方向性を決めている。本研究分野では、3月までの在任期間に、組織形態が最終的な精密構造に仕上げられる機構について細胞内小胞の限局した膜融合に関わる t-SNARE に着目し解析した。エピモルフィン (=syntaxin2) は間質の細胞で必要に応じて即座に方向性を持って分泌され直近の上皮組織の形態変化を促すことで知られるが、上皮細胞自身が発現するエピモルフィン類似物質 syntaxin3 および 4 についても一部が必要時に分泌されエピモルフィンと共同して上皮挙動を精密に制御している可能性が見出された(図 1)。今後は本知見を加味して組織の高次構造の制御技術につなげたい。

Organogenesis is directed by the concerted action of many signaling factors for tissue remodeling and cell differentiation. Until this March our laboratory has analyzed the possible involvement of t-SNARE proteins, which mediate fusions of cytoplasmic vesicles to a specific cell membrane, in the construction of well-shaped tissue architectures. Previously, we demonstrated that syntaxin2/epimorphin is expressed in the stromal cells and the subpopulation is secreted extracellularly to elicit morphogenic programs in adjacent epithelia. Here, we detected syntaxin 3 and 4 in the epithelial compartment of the mammary gland, and their peptide-tagged transgene products appeared to be secreted extracellularly from the same cells as the c-terminally truncated form, implying that locally secreted syntaxins (syntaxin 2, 3 and 4) cooperatively and spatio-temporally control the epithelial morphogenesis (Fig. 1). Attempts to uncover the molecular mechanism underlying the regulation of tissue morphogenesis will be continued.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Yamada, M., Oda, T., Higashi, K., Kushiya, T., Yamakami, K., Sakurai, Y., Hirai, Y., Yamamoto, K., Hyodo, T., Suzuki, S., Miura, S. and Kumagai, H. Involvement of epimorphin in the repair of experimental renal fibrosis in mice. Lab. Invest. In press

2) 総説

奥川洋司, 平井洋平 エピモルフィンの膜トポロジーと生理機能 化学と生物 47, 781-785 (2009)

◆ 学会等の発表 ◆

講演会・シンポジウム

平井洋平 機能性ペプチドの皮膚外用剤への応用可能性 再生医療の実用化に関するニーズ発表会 2009.10.10 (神戸)

客員教授 鳥光 慶一

Visiting Prof. Keiichi Torimitsu

【研究概要】

生体における情報伝達機能の解明とその利用を目標に、神経伝達関連の受容体タンパク質の構造と機能の相関性について明らかにすることにより、将来のバイオメテックなデバイス実現の可能性について研究を進めている。

研究は、(1) AFM による精製及び再構成した受容体タンパク質の動的構造観察 (2) MEA による神経活動計測 (3) 脂質膜を用いた生体分子輸送を中心に進め、海外研究機関との共同研究も行った。

特にオックスフォード大学とは、研究室を設置し、相互訪問による情報交換及び研究交流受を行うとともにワークショップを開催することにより、受容体タンパク質の構造制御／観察に関する研究を推進した。その他、中国科学院、アデレード大学との間で補完的、相乗的となるよう研究を進めた。

(1) AFM による精製及び再構成した受容体タンパク質の動的構造観察

受容体タンパク質は、生体内の情報伝達において重要な役割を担っており、その機能を理解し、構造との相関性を理解することは生体における情報伝達の仕組みを考え、利用する上で極めて重要である。溶液中での原子間力顕微鏡 (AFM) の利用は、生理条件下における受容体タンパク質のナノスケールでの構造解析に有効な手段である。

今回、ATP 受容体である P2X4 受容体、及び NMDA 受容体について検討を行い、P2X4 受容体については、構造及び活性化に伴う構造変化と、それに対応する機能の測定に成功し、成果については PLoS Biology に掲載され

た。また、NMDA 受容体に関しては、クライオ TEM で報告されている AMPA 受容体に類似した構造の観察に成功し、細胞外ドメイン(N 末ドメイン)が活性化に伴い、大きな変化を引き起こす事を示すことができた。

現在、機能との相関性解析のため、ナノ構造体を用いた電気信号解析を進めている。

一方、英国オックスフォード大学との共同研究では、AMPA 受容体の脂質膜への再構成において、ドメイン構造の違いによる局在性が認められた。

(2) MEA による神経活動計測

神経細胞を介したコミュニケーション手段の構築は、生体における情報処理機構を理解・利用する上で極めて重要であり、我々は、MEA(多点微小電極アレイ)をベースにしたインターフェイス構築を目標に、神経系との長期接合・シナプスの機能解析に取り組んでいる。導電性高分子ゲルの利用は、生体適合性も高く、インピーダンス低減に有効であることから、多点電極と組み合わせ、数ヶ月以上の長期間に渡る神経活動計測／刺激を行った。計測系については、慶応義塾大学と共同で LSI チップ化によるスケールダウンに取り組み、張り付けや埋込が可能なインターフェイス実現に向けた研究を進めた。

Mg は、その欠乏が重大な疾患を引き起こすなど、生体活動における必須元素としてよく知られている。しかしながら、その神経活動に及ぼす影響については、よくわかっておらず、蛍光プローブによる細胞内 Mg 測定による Mg 動態の解析を行い、受容体局在との相関性を明らかにした。

(3) 脂質膜を用いた生体分子輸送

脂質分子を表面に修飾した金ナノロッドを用いた自己組織化による配向・間隔制御を行ってきた。表面へ抗体を化学修飾し、ナノ界面で起こる生体分子間反応を調べることで、分子レベルでの反応時間変化を観測した。

一方、Ni 錯体を利用した脂質ドメイン構造制御を行い、ヒスチジンタグ化による GFP の固定化と脂質自発展開を組み合わせた分子輸送を実現、ナノギャップ構造による分子の輸送評価につなげた。

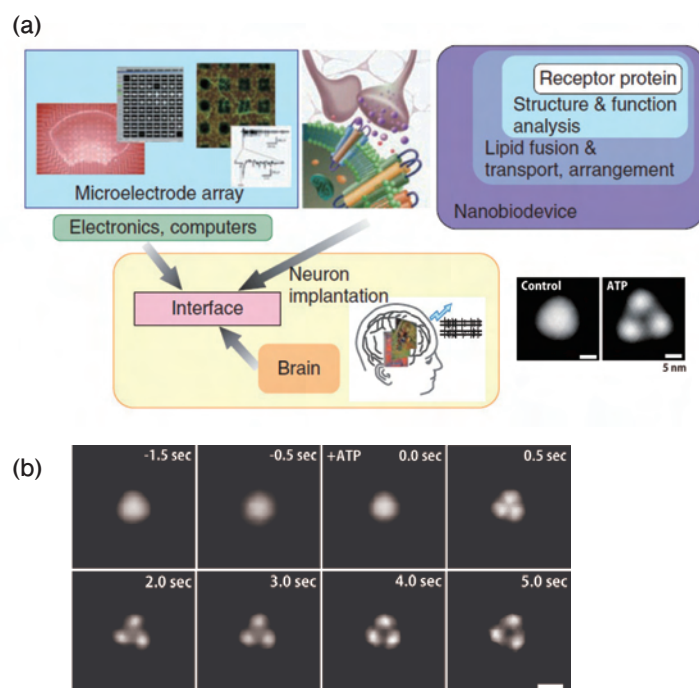


図 受容体タンパク質を使った研究目標(a)と、P2X4 受容体の高速 AFM による連続計測(b)

Our interest is to understand the mechanism of information processing in the brain and to develop devices that can communicate with the brain using receptor proteins. The key idea behind is the fusion of receptor conformation/function and synaptic connection/function. We are studying the conformational changes induced by neurotransmitter reception to enable us to understand the relationship between conformational change and function.

Here I describe our study of (1) Conformational analysis of purified/reconstituted receptor protein by AFM (2) Neural activity measurement using MEA (3) Bio-molecular placement/transport using lipid bilayer. Some studies were carried with foreign universities based on collaboration, such as University of Oxford, CAS and University of Adelaide.

(1) Conformational analysis of purified/reconstituted receptor protein by AFM

Although we know receptor protein is very important in the information processing, it is extremely difficult to visualize the conformational changes in a receptor under physiological conditions. Only a few technologies, such as cryogenic transmission electron microscopy and X-ray diffraction can provide us with images of single receptors. This is because of the size of receptors and they work only in liquid. Therefore, images should be collected in liquid, whereas most methods require dry conditions or low temperature.

We have succeeded in visualizing these receptors of P2X4 and NMDA under physiological conditions in real time by using high-speed atomic force microscopy. The results (P2X4) were published in PLoS Biol. As the receptor normally works with a membrane, we study either in purified or reconstituted with membrane receptors for the analysis. We collaborate with Univ. Oxford for the analysis of AMPA receptors and found the domain effect on receptor localization.

(2) Neural activity measurement using MEA

Constructing an interface between neurons and electrical instruments is one of our goals to develop communication tools with brain. We use conducting polymer hydrogels to achieve better biocompatibility and low impedance. Major challenges are to have a longer connection and to miniaturize our measurement system into an LSI chip. We hope this could achieve implantable interface formation for medical support.

Mg is well known as a important ion in our metabolism. Its deficiency causes sever problems in our health. As little is known, however, for their role in the neural activities, we studied change in intracellular Mg concentration with fluorescent probe and found its relation to receptor localization.

(3) Bio-molecule placement/transport using lipid bilayer

Controlling receptor protein placement and alignment is a key to analyze their function and to develop nanobiodevices. We are studying protein placement using either a gold nanodot array or gold nanorod array. We also use self-spreading lipid bilayers for this purpose. Controlling self-assembly is a big challenge for achieving desired alignments. We modified gold nanorod with lipid-membrane and found its bio-sensing capability based on the localized surface plasmons. Molecular interactions were analyzed with this method.

Another approach for protein transport is to use tagging. GFP was transported with this method of using his-

tidine tag.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Y. Kashimura, T. Goto, H. Nakashima, K. Furukawa, E. Wang, H. Li, W. Hu, K. Torimitsu, Transistor Properties of Novel Organic Conductive Polymers Bearing Tetrathiafulvalene Units in the Backbone, *Jpn. J. Appl. Phys.* in press
- K. Sumitomo, Y. Shinozaki, D. Takagi, H. Nakashima, Y. Kobayashi and K. Torimitsu, AFM observation of membrane proteins suspended over CNT network, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **48**, 08JB18-1-4 (2009)
- 篠崎陽一, 住友弘二, 津田 誠, 小泉修一, 井上和秀, 鳥光慶一: 高速原子間力顕微鏡を用いた受容体の一分子イメージング, 日薬理誌(*Folia Pharmacol. Jpn.*) 134 巻, 2 号, 68-72 (2009)
- Y. Kashimura, T. Goto, K. Furukawa, E. Wang, H. Li, W. Hu, K. Torimitsu, Structural and Electrical Properties of Organic Conductive Polymers Bearing Tetrathiafulvalene Backbone, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **504**, 231-237 (2009)
- Y. Shinozaki, K. Sumitomo, M. Tsuda, S. Koizumi, K. Inoue and K. Torimitsu, Direct observation of ATP-induced conformational changes of single P2X4 receptor/channel, *PLoS Biol.*, **7** (5), e1000103-1- e1000103-12 (2009)
- H. Dong, H. Li, E. Wang, S. Yan, J. Zhang, C. Yang, I. Takahashi, H. Nakashima, K. Torimitsu, W. Hu, Molecular Orientation and Field-effect Transistors of a Rigid Rod Conjugated Polymer Thin Films, *J. Phys. Chem. B*, **113** (13), 4176-4180 (2009)
- A. Shimada, N. Kasai, Y. Furukawa, T. Nyberg, K. Torimitsu, Neural signal transmission measurements with a conductive polymer microelectrode array, *IEEJ Trans. EIS*, **129** (2), 267-271 (2009)
- N. Kasai, C. S. Ramanujan, Y. Shinozaki, K. Sumitomo, J. F. Ryan, K. Torimitsu, Single molecular imaging of receptor proteins, *J. Soc. Chem. Micro-Nano Sys.*, **8** (1), 1-6 (2009)

2) 著 書

- 鳥光慶一, 島田明佳, 古川由里子, バイオ評価技術, 分子エレクトロニクスの基板技術と将来展望(CMC 出版), 53-79 (2009)

3) 総 説

- 鳥光慶一, NTT におけるナノバイオ研究の概要, NTT 技術ジャーナル, **21**, 12-15 (2009)
- K. Torimitsu, Nanobio Research at NTT, NTT Technical Review, **7**, 1-5 (2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Y. Shinozaki, K. Sumitomo, M. Tsuda, S. Koizumi, K. Inoue and K. Torimitsu, Direct visualization of single receptor dynamics: the relationship between molecular structure and physiology/pathology, *ISNM2009-2* (2009.11.4-11.9 Okazaki, Japan)
- J. Baranovic, C.S. Ramanujan, N. Kasai, Y. Shinozaki, K. Torimitsu and J. F. Ryan, AMPA receptors in laterally heterogeneous lipid bilayers, *39th annual meeting of the Society for Neuroscience, Neuroscience 2009* (2009.10.17-10.21 Chicago, USA)
- N. Kasai, T. Balois, C.S. Ramanujan, Y. Shinozaki, K. Sumitomo, J.F. Ryan and K. Torimitsu, Orientation of AMPA receptors reconstituted into artificial lipid bilayer, *39th annual meeting of the Society for Neuroscience, Neuroscience 2009* (2009.10.17-10.21 Chicago, USA)
- M. Yamaguchi, T. Iwata, N. Nakano, A. Shimada, N. Kasai and K. Torimitsu, A design of CMOS LSI for multisite stimulation and the measurement with microelectrode array, *39th annual meeting of the Society for Neuroscience, Neuroscience 2009* (2009.10.17-10.21 Chicago, USA)
- A. Shimada, N. Kasai and K. Torimitsu, High-density and Low-impedance microelectrode array with layered wiring, *39th annual meeting of the Society for Neuroscience, Neuroscience 2009* (2009.10.17-10.21 Chicago, USA)
- M. Yamaguchi, N. Nakano, A. Shimada and K. Torimitsu, Multi-channel bio sensing and stimulation LSI chip by 0.18 μ m process CMOS technology, *SSDM* (2009.10.6-10.9 Sendai, Japan)
- A. Shimada, N. Kasai and K. Torimitsu, Neural signal measurements with a conductive- polymer microelectrode array, *XXXVI Int. Congress of Physiological Sciences, IUPS2009* (2009.7.27-8.1 Kyoto, Japan)
- N. Kasai, C.S. Ramanujan, J. Baranovic, Y. Shinozaki, A. Shimada, K. Sumitomo, J.F. Ryan and K. Torimitsu, Structural observation of a single, reconstituted ionotropic glutamate receptor, *XXXVI Int. Congress of Physiological Sciences, IUPS2009* (2009.7.27-8.1 Kyoto, Japan)
- Y. Shinozaki, K. Sumitomo, M. Tsuda, S. Koizumi, K Inoue and K. Torimitsu, Dynamic structural changes in single P2X4 receptors observed with fast-scanning atomic force microscopy, *XXXVI Int. Congress of Physiological Sciences, IUPS2009*, Kyoto, Japan (2009.7.27-8.1 Kyoto, Japan)
- Y. Shinozaki, K. Sumitomo, M. Tsuda, S. Koizumi, K Inoue and K. Torimitsu, Localization of P2X4 receptors in lipid raft-structure of an *in vitro* model of cell membrane, *Fukuoka Purine 2009* (2009.7.23-7.25 Fukuoka, Japan)
- H. Nakashima, K. Furukawa, Y. Shinozaki, K. Sumitomo and K. Torimitsu, Molecular-scale detection of antigen-antibody reaction on 2D arrayed gold nanorods, *83rd ACS Colloid and Surface Science Symposium* (2009.6.14-6.19 New York, USA)
- Y. Kashimura, T. Goto, H. Nakashima, K. Furukawa, E. Wang, H. Li, W. Hu, K. Torimitsu, Transistor properties of novel organic conducting polymer incorporating a tetrathiafulvalene unit in its backbone, *5th International Conference on Molecular and Bio Electronics (M&BE5)* (2009.3.15-18 Miyazaki, Japan)
- C. S. Ramanujan, N. Kasai, M. Suggit, J. Baranovic, K. Torimitsu and J. F. Ryan, The preferential reconstitution of AMPA receptor proteins into model lipid domains incorporating cholesterol studied by atomic microscopy - an imaging and force spectroscopy study, *Biophysical Society 53rd Annual Meeting* (2009.2.28-3.4 Boston,

USA)

檜村吉晃, 後藤東一郎, 中島 寛, 古川一暁, E. Wang, H.Li, W. Hu, 鳥光慶一, テトラチアフルバレンを主鎖骨格に持つ導電性高分子の構造と物性, 第56回応用物理学関係連合講演会(2009.3.30-4.2 筑波)

原田裕一, C. S. Ramanujan, J. F. Ryan 鳥光慶一, ナノサイズの水における量子化コンダクタンス, 第56回応用物理学関係連合講演会(2009.3.30-4.2 筑波)

中島 寛, 古川一暁, 篠崎陽一, 住友弘二, 鳥光慶一, アレイ化金ナノロッド薄膜上での分子レベルの生体分子間反応計測, 第89回日本科学会春季年会(2009.3.27-30 船橋)

篠崎陽一, 住友弘二, 小泉修一, 津田 誠, 井上和秀, 鳥光慶一, グリア細胞に発現するストレス応答に関わるATP受容体の解析, 第13回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム(2009.1.10 愛知)

中島 寛, 住友弘二, 古川一暁, 篠崎陽一, 鳥光慶一, Niキレート脂質を含む混合脂質膜のドメイン構造形成とGFPの位置選択的固定化, 第62回コロイドおよび界面化学討論会予稿(2009.06.15 岡山)

檜村吉晃, 後藤東一郎, 中島 寛, 古川一暁, E. Wang, H.Li, W. Hu, 鳥光慶一, 分子導線実現に向けた新規 π 共役高分子の開発, 第58回高分子討論会 (2009.9.16-18 熊本)

2) 講演・シンポジウム

K. Torimitsu, Understanding receptor protein structure and functions for biomimetic device, *ISNM2009-2, Okazaki, Japan, 2009.11.4-11.9* (招待講演, Special Lecture)

K. Torimitsu, Magnesium Effect on Neural Development *in vitro*, *12th International Magnesium Symposium* (2009.9.22-25, Lasi, Romania) (招待講演, Plenary talk)

N. Nakano, M. Yamaguchi, A. Shimada and K. Torimitsu, Multisite stimulation and sensing by custom LSI chip by CMOS technologies and microelectrode array, *11th Annual YUCOMAT 2009 Conference* (2009.8.31-9.4, Herceg Novi, Serbia) (招待講演)

再生統御学研究部門

発生分化研究分野

Department of Development and Differentiation

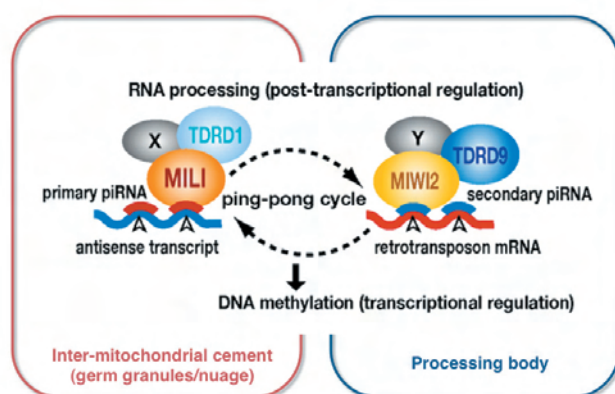
分野主任 教授 中辻 憲夫

Prof. Norio Nakatsuji

【研究概要】

生殖細胞はゲノム情報を次世代に伝達し、個体発生の起点となる細胞系譜である。その発生分化プロセスでは個体発生能の形成、ゲノム再プログラム化、DNA 組換え等重要な生命現象が起こる。当研究グループでは、(1)生殖細胞に特徴的に観察される生殖顆粒構造の構成分子同定と機能解析、(2)生殖幹細胞の減数分裂移行を制御する分子シグナル経路とクロマチン動態、(3)ショウジョウバエを用いた生殖幹細胞のニッチ微小環境、の研究を進めている。

(1) 生殖細胞に顕著に観察される構造的特徴に生殖顆粒 RNP 構造が挙げられる。同構造は世代、種を越えて観察されることから生殖細胞の特性に重要な役割を担うものと考えられるが、その分子機能は殆ど明らかになっていない。我々はマウス生殖顆粒の特異的な構成分子をコードする tudor 関連 Tdrd 遺伝子群の機能解析を進めている。Tdrd1, 6, 7, 9 ノックアウトマウスを作製した所、これら遺伝子のホモ欠損個体はいずれも雄生殖細胞の分化過程に異常を示す事が明らかとなった。このうち TDRD1, 9 はマウス piwi ファミリー MILI, MIWI2 と相互作用し、胎仔期前精原細胞において piRNA 生合成経路を介してレトロトランスポゾン LINE-1 の RNA, エピゲノムレベルでの抑制成立に機能する事が明らかとなった。精原幹細胞の LINE-1 制御の破綻は減数分裂期で同レトロトランスポゾンの過剰発現を招き、ゲノム DNA 障害等による広範な細胞死を誘起する。一方、TDRD6, 7 は精子細胞の



TDRD1, TDRD9 蛋白質は MILI, MIWI2 蛋白質と各々異なった RNP 複合体を形成し、胎仔前精原細胞において inter-mitochondrial cement, processing body に局在する。これら tudor, piwi 蛋白質は piRNA 経路を介してレトロトランスポゾンの RNA, エピゲノムレベルでの抑制に働く。

TDRD9 and TDRD1 associate with MIWI2 and MILI respectively and form discrete subcellular compartments, which correspond to processing bodies and inter-mitochondrial cement in fetal prospermatogonia. These piwi and tudor proteins function in the piRNA pathway and retrotransposon silencing.

半数体成熟過程で働く。Tdrd6, 7 ノックアウトマウスでは精子細胞に特徴的な生殖顆粒構造である chromatoid body の形成不全が観察されるが, Tdrd1, 9 とは異なりレトロトランスポゾンのエピゲノム制御の破綻は検出されない。Chromatoid body は RNA 代謝に関わる processing body と構成分子が類似しており, 現在 TDRD6, 7 と mRNA 翻訳制御について解析を進めている。また TDRD 蛋白質群を分子マーカーとして雄生殖顆粒の単離精製とマイクロアレイ, プロテオーム解析による構成蛋白質, RNA の網羅的同定, 生殖顆粒の包括的分子プロファイリングを進めている。

(2) 生殖細胞ゲノムの安定な保持と伝達は個体, 種の継続に重要である一方, 減数分裂による 1 倍体化と相同遺伝子組換えによって遺伝情報の多様性が生まれる。減数分裂の制御機構の研究は主に酵母等の単細胞生物を用いて行われており, 多細胞生物においてその分子基盤の解明は進んでいない。我々はこれまでにマウス胎仔生殖細胞が培養下で自律的に減数分裂へ移行する事, およびその自律的な減数分裂移行を抑制する分子を同定しているが, 新たに精原細胞由来樹立株を用いて体細胞分裂から減数分裂を誘導する培養条件を作出した。この培養系を用いて減数分裂を促進および抑制するシグナル経路を同定したので, 更に分子から個体レベルでの詳細な研究を進めている。一方, 相同遺伝子組換え, クロマチン構造転換への関与が推測される遺伝子群を蛋白質ドメイン構造, 発現パターン, 進化的保存等によりゲノムデータベースからスクリーニングし, 遺伝学的, 生化学的解析を進めている。これらの研究により哺乳類相同遺伝子組換えの分子基盤を明らかにし, 新たな遺伝子改変技術への応用を目指す。

(3) 幹細胞は生体内の様々な組織に存在しており, その未分化性維持には幹細胞自身に加えてニッチと呼ばれる周囲の微小環境が重要な役割を果たしている。しかし哺乳類の生体幹細胞およびニッチの厳密な同定と解析は必ずしも容易では無く, 生体幹細胞の自己複製や分化制御の分子レベルでの研究を進める上で律速段階となっている。我々は生殖幹細胞およびニッチの体系的な遺伝学的解析が可能であるショウジョウバエ精巣をモデルに用いて TGF-beta シグナル経路が幹細胞の未分化維持に直接関与している事を見い出しており, 現在その詳細な分子機構について研究を進めている。

The germline is the cell lineage that gives rise to full ontogenesis of individuals and transmits genetic information to next generations. During the differentiation of germ cells, important biological processes take place, such as epigenetic reprogramming, establishment of pluripotency and genetic DNA recombination. Our current research focuses on (1) the molecular characterization of germinal granules/nuage, germline-specific ribonucleoprotein (RNP) assemblies in the cytoplasm, (2) the regulation of meiotic entry and chromatin dynamics, and (3) the molecular systems governing stem cell niche environments.

(1) One structural characteristic observed in the germline is a cytoplasmic RNP domain called germinal granules or nuage. The germinal granule/nuage is evolutionarily conserved in divergent animals, suggesting its essential and common role in the germline, but the precise molecular and physiological function(s) remains unclear. We are working on the tudor-domain containing (Tdrd) genes, mainly Tdrd1, 6, 7 and 9, which encode for specific components of mammalian germinal granules/nuage. Gene-targeted disruption of Tdrd1, 6, 7 and 9 all led to male-specific sterility due to postnatal defects in spermatogenesis. Among these, TDRD1 and TDRD9 cooperate with piwi proteins, MILI and MIWI2, respectively, and function non-redundantly in retrotransposon silencing at RNA

and epigenetic levels in spermatogonial stem cells and following spermatogenesis. In contrast, Tdrd6 and 7 function in haploid spermiogenesis. Tdrd6 and 7 mutants show abnormal spermatid differentiation with aberrant chromatoid body architectures. Chromatoid bodies, a specialized form of germinal granules/nuage in spermatids, share some of their components with somatic processing bodies (p bodies), a form of mRNPs implicated in degradation or translational control of mRNAs. We are now addressing the possible function of TDRD6 and 7 in the regulation/metabolism of RNA.

(2) Molecular mechanisms controlling meiotic entry and chromatin dynamics are important research subjects in cell and developmental biology. We previously showed that primordial germ cells in mice autonomously enter into meiosis when cultured in vitro and identified a factor that suppresses this meiotic transition from mitosis. Recently, we established another in vitro culture system that induces meiosis initiation of an established germline stem cell line derived from spermatogonia. By using this culture system, we identified signaling molecules that promote or inhibit meiosis from mitotic spermatogonial stem cells. We are now undertaking biochemical and genetic characterization of these signaling pathways in vitro and in vivo. Meanwhile, we have carried out genome database screening and identified candidate genes that possibly participate in chromatin regulation in germline cells in mice. Further studies on these gene functions are in progress.

(3) Stem cells are responsible for replacing damaged or dying cells in various adult tissues throughout a lifetime. Stem cell behavior has been shown to be controlled by specialized regulatory microenvironments i.e. “niche” in many organisms. However, niche signals in many stem cell systems are still poorly defined. The *Drosophila* testis is one of the premiere stem cell models to study molecular mechanisms governing stem cell self-renewal, differentiation and niche regulation. We previously showed that TGF-beta signaling from somatic cells is essential for maintaining germline stem cells (GSCs) in the *Drosophila* testis and are currently addressing how TGF-beta signaling maintains GSCs in *Drosophila*.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Kojima, K., Kuramochi-Miyagawa, S., Chuma, S., Tanaka, T., Nakatsuji, N., Kimura, T. and Nakano, T. Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells. *Genes Cells* **14**: 1155-1165 (2009)

Mitsui, K., Suzuki, K., Aizawa, E., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K. Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**: 711-717 (2009)

Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Chuma, S., Nakatsuji, N., Takehashi, M. and Shinohara, T. Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *Plos One* **4**: e7909 (2009)

Reuter, M., Chuma, S., Tanaka, T., Franz, T., Stark, A., Pillai, R.S. Loss of the Mili-interacting Tudor domain-

- containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat Struct Mol Biol.* **16** : 639-46(2009)
- Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., Hata, K., Martin, S. L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R. S., Nakatsuji, N. and Chuma, S. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Developmental Cell* **17** : 775-787(2009)
- Tada, M., Matsumura, H., Kurose, Y., Nakatsuji, N. and Tada, T. Target chromosomes of inducible deletion by a Cre /inverted loxP system in mouse embryonic stem cells. *Chromosome Res.* **17** : 443-450(2009)
- Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., Hata, K., Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., Tanaka, Y., Toyokuni, S., Sasaki, H., Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara, T. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol Reprod.* **81** : 155-64(2009)
- Taura, D., Noguchi, M., Sone, M., Hosoda, K., Mori, E., Okada, Y., Takahashi, K., Homma, K., Oyamada, N., Inuzuka, M., Sonoyama, T., Ebihara, K., Tamura, N., Itoh, H., Suemori, H., Nakatsuji, N., Okano, H., Yamanaka, S. and Nakao, K. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells : Comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett.* **583** : 1029-1033(2009)
- Vagin, V.V., Wohlschlegel, J., Qu, J., Jonsson, Z., Huang, X., Chuma, S., Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., Aravin, A.A. Proteomic analysis of murine Piwi protein reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev.* **23** : 1749-62(2009)
- Wada, T., Honda, M., Minami, I., Tooi, N., Amagai, Y., Nakatsuji, N. and Aiba, K. Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells. *PLoS ONE* **4** : e6722(2009)
- Wang, J., Saxe, J.P., Tanaka, T., Chuma, S., Lin, H. Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. *Curr Biol.* **19** : 640-4(2009)
- Yamaguchi, S., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Sasaki, H., Nakatsuji, N., Saitou, M., and Tada, T. Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development* **136** : 4011-4020(2009)
- Yamauchi, K., Hasegawa, K., Chuma, S., Nakatsuji, N. and Suemori, H. In vitro germ cell differentiation from cynomolgus monkey embryonic stem cells. *PLoS ONE* **4** : e5338(2009)

2) 総 説

- Chuma, S., Hosokawa, M., Tanaka, T. and Nakatsuji, N. Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline : Germinal granules in mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* **306** : 17-23(2009)
- Chuma, S., Pillai, R.S. Retrotransposon silencing by piRNAs : ping-pong players mark their sub-cellular boundaries. *PLoS Genet* **5** : e1000770(2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

中馬新一郎, 中辻憲夫: 哺乳類生殖顆粒 RNP 構造と TDRD ファミリー. 特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第2回公開シンポジウム(2009.11.27 東京)

Takashi Tanaka, Mihoko Hosokawa, Satomi Kuramochi-Miyagawa, Toru Nakano, Michael Reuter, Ramesh Pillai, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma: Tdrd6 is essential for structural and molecular integrity of the chromatin body and male germ cell differentiation in mice. 日本発生生物学会第42回大会(2009.5.28-31 新潟)

Takashi Tanaka, Mihoko Hosokawa, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma: The roles of tudor genes in mammalian spermatogenesis. 第32回日本分子生物学会年会(2009.12.9-12 横浜)

Takashi Tanaka, Mihoko Hosokawa, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma: The roles of tudor genes in mammalian spermatogenesis. 京都大学再生医科学研究所平成21年度学術講演会「再生医学再生医療の先端融合的共同研究拠点」(2009.12.14 京都)

Toshiaki Watanabe, Shinichiro Chuma, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Yasuhiro Yamamoto, Yuko Hoki, Asao Fujiyama, Noriyuki Kitagawa, Norio Nakatsuji, Takashi Sado, Hiroyuki Sasaki: Zucchini is a mitochondrial protein, required for spermatogenesis and piRNA biogenesis in mouse. 第32日本分子生物学会年会(2009.12.11 横浜)

2) 講演・シンポジウム

中辻憲夫: 多能性幹細胞株の限らない可能性と医学および創薬への活用. 日本薬学会第129年会「創と療の伝統と革新」・特別講演(2009.3.26 京都)

中辻憲夫: ヒト ES 細胞株を用いた疾患モデル細胞作成および創薬毒性スクリーニングへの応用. 英国再生医療センターワークショップ・特別講演(2009.6.22 大阪)

中辻憲夫: 実用化が始まった多能性幹細胞(ES/iPS 細胞): 新薬開発研究と安全性試験の必須ツール. 第8回国際バイオ EXPO・特別講演(2009.7.3 東京)

Nakatsuji, N.: Embryonic and other pluripotent stem cells as versatile tools for medical research, drug discovery and toxicology testing. Biotechnology Taiwan 2009. International Symposium of Stem Cells, Vaccine, and Molecular Medicine. Keynote Lecture(2009.11.7 Taipei)

Nakatsuji, N.: Embryonic stem cells and other pluripotent stem cells as versatile tools for basic research, cell therapy and drug discovery. 11th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry. Plenary Lecture(2009.11.13 Kyoto)



再生誘導研究分野 Department of Stem Cell Biology

分野主任 教授 山中 伸弥

Prof. Shinya Yamanaka

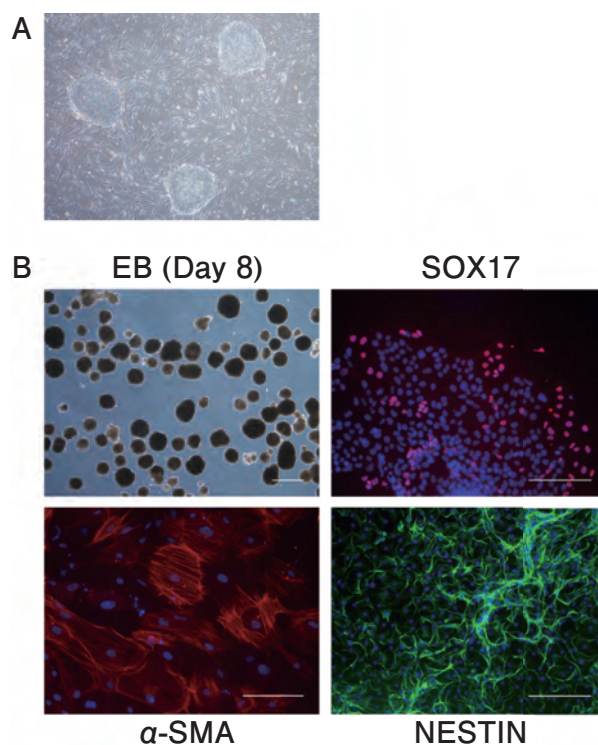
【研究概要】

4つの転写因子(Oct3/4, Sox2, Klf4 および c-Myc)をレトロウイルスベクターで導入することにより、ヒトとマウス線維芽細胞を多能性細胞へ変化させることに成功した。この人工多能性幹(induced pluripotent stem; iPS)細胞と名付けられた細胞は、遺伝子発現や試験管内での分化能のみならず、キメラマウスの生殖系列にも寄与し、胚性幹(Embryonic stem; ES)細胞と遜色ないことを示した。また、患者由来のiPS細胞は病態解明、毒性解析などの再生医学に応用できると考えられる。しかし、樹立効率の低さやキメラマウスにおける腫瘍形成の問題があり臨床応用へ用いるには不完全であった。

初期化の効率は低く、また、腫瘍形成の原因になるレトロウイルスのc-Mycを用いないとさらに効率が低下することが分かっている。癌抑制遺伝子 p53 を siRNA を用いて機能抑制することでヒト iPS 細胞の樹立効率が上昇することが分かっていたが、そのメカニズムは不明であった。我々はc-Mycを用いなくてもp53の欠失により初期化効率が10%にまで上昇することを見いだした。プラスミドを用いた場合にも同様であった。また我々は低酸素条件で初期化を行うことでiPS細胞の樹立効率が上昇することも発見した。これらの知見により樹立効率の低さの改善が進んだと考える。

我々は様々なiPS細胞から作った神経前駆細胞の腫瘍形成能の評価を行った。マウス線維芽細胞由来iPS細胞の腫瘍形成能は胚性幹細胞(ES細胞)のそれと同様に低かった。しかし、生体組織由来細胞から樹立したiPS細胞を用いた場合高頻度で腫瘍形成が認められる場合があり、それは由来細胞に依存することが明らかとなった。このことから、iPS細胞を樹立する元細胞の選択が重要であることが明らかとなった。

iPS細胞を再生医療に用いる場合異種成分を含まない培養系の確立が重要である。我々はヒトiPS細胞を自己細胞フィーダー細胞として樹立・維持することが可能であることを示した。このことは、自身の皮膚線維芽細胞がiPS細胞のソースとしてだけでなく、フィーダー細胞としても有用であることを示しており、



A
自己フィーダー細胞上で増殖する73歳男性由来のiPS細胞。26世代以上安定に維持が可能であった。
iPS cells derived from 73 years old male on autologous feeders.

B
胚様体(EB)形成による試験管内分化誘導。内胚葉(SOX17)、中胚葉(α-SMA)および外胚葉(NESTIN)マーカー陽性の細胞が確認された。
in vitro differentiation by embryoid body(EB)formation. Endoderm (SOX17), mesoderm (α-SMA) and ectoderm (NESTIN) marker-positive cells could be observed.

多能性幹細胞における問題の一つが解決される可能性を示したものであり、医療応用品質の iPS 細胞作製において重要な一歩であると考えられる。(文責：中川)

We have discovered that the retroviral transduction of four transcription factors, Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc, could change human and mouse fibroblasts into a pluripotent state. We named these reprogrammed cells induced pluripotent stem (iPS) cells. These iPS cells have been observed to notably contribute to adult chimera mice and also their offspring through the germ line. Patient, or disease-specific iPS cells are therefore considered to possibly help elucidate the pathogenesis of diseases, while also being useful for drug screening, toxicology studies and regenerative medicine. However, some critical issues, such as their low efficiency and tumorigenicity, still remain to be overcome before the clinical application of iPS cells can be successfully achieved.

The efficiency of the reprogramming process, however, remains low. Pluripotency can be induced without c-Myc, but only at the cost of an even lower efficiency. A p53 (also known as TP53 in humans and Trp53 in mice) short-interfering RNA (siRNA) has been recently shown to promote human iPS cell generation, but the specificity and mechanisms of this phenomenon remain to be determined. We also reported that up to 10% of transduced mouse embryonic fibroblasts lacking p53 successfully transformed into iPS cells, even without the use of the Myc retrovirus. Such p53 deletion also promoted the induction of integration-free mouse iPS cells with plasmid transfection. The suppression of p53 also increased the efficiency of human iPS cell generation. We also showed that conducting reprogramming under hypoxic conditions resulted in an improved efficiency for both mouse and human cells.

We evaluated the teratoma-forming propensity of the secondary neurospheres (SNS) generated from several mouse iPS cell lines. The teratoma-formation of SNS from embryonic fibroblast-derived iPS cells was similar to that of SNS from embryonic stem (ES) cells. In contrast, SNS from iPS cells derived from different adult tissues varied substantially in their teratoma-forming propensity, which correlated with the persistence of undifferentiated cells.

In order for induced Pluripotent Stem (iPS) cells to be successfully applied to therapeutic usage, the accomplishment of a xeno-free culture is critical. We demonstrated that human induced Pluripotent Stem (iPS) cells could be established and maintained on isogenic parental feeder cells. This result suggests that autologous fibroblasts may therefore be useful as not only a source for iPS cells, but also as feeder layers. Our results therefore suggest that it may be possible to solve this dilemma using isogenic fibroblasts as feeder layers for iPS cells. This is an important step toward the establishment of clinical grade iPS cells.(文責：中川)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Hiramatsu, K., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., Takehara, S., Higaki, K., Nakagawa, M., Takahashi, K., Yamanaka, S., and Oshimura, M.: Complete genetic correction of iPS cells from duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* **in press** (2009)

Takahashi, K., Narita, M., Yokura, M., Ichisaka, T., Yamanaka, S.: Human induced pluripotent stem cells on autolo-

- gous feeders. PLoS ONE. **4** : e8067 (2009)
- Nagata, S., Toyoda, M., Yamaguchi, S., Hirano, K., Makino, H., Nishino, K., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Nakagawa, M., Yamanaka, S., Akutsu, H., Umezawa, A., and Tada, T. : Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells*. **14** : 1395-1404 (2009)
- Nakamura, K., Salomonis, N., Tomoda, K., Yamanaka, S., and Conklin, B.R. : Gi-Coupled GPCR signaling controls the formation and organization of human pluripotent colonies. PLoS ONE. **4** : e7780 (2009)
- Tanaka, Y., Ikeda, T., Kishi, Y., Masuda, S., Shibata, H., Takeuchi, K., Komura, M., Iwanaka, T., Muramatsu, S., Kondo, Y., Takahashi, K., Yamanaka, S., and Hanazono, Y. : ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. *Cell Transplant*. **18** : 381-389 (2009)
- Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., and Kohno, K. : Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106** : 16657-16662 (2009)
- Nishimura, K., Nakagawa, M., Ono, K., Ogita, H., Sakamoto, T., Yamamoto, N., Okita, K., Yamanaka, S., and Ito, J. : Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport*. **20** : 1250-1254 (2009)
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. : Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*. **138** : 722-737 (2009)
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. : Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. **5** : 237-241 (2009)
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. : Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*. **460** : 1132-1135 (2009)
- Yokoo, N., Baba, S., Kaichi, S., Niwa, A., Mima, T., Doi, H., Yamanaka, S., Nakahata, T., and Heike, T. : The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **387** : 482-488 (2009)
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H., and Yamanaka, S. : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. **27** : 743-745 (2009)
- Niwa, A., Umeda, K., Chang, H., Saito, M., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Yamanaka, S., Nakahata, T., and Heike, T. : Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1+ hemoangiogenic progenitors. *J Cell Physiol*. **221** : 367-377 (2009)
- Tanaka, T., Tohyama, S., Murata, M., Nomura, F., Kaneko, T., Chen, H., Hattori, F., Egashira, T., Seki, T., Ohno, Y., Koshimizu, U., Yuasa, S., Ogawa, S., Yamanaka, S., Yasuda, K., and Fukuda, K. : In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. **385** : 497-502 (2009)
- Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H., Yoshimura, N., and Takahashi, M. : Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett*. **458** : 126-131 (2009)
- Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. : Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells*. **14** : 683-694 (2009)
- Taura, D., Sone, M., Homma, K., Oyamada, N., Takahashi, K., Tamura, N., Yamanaka, S., and Nakao, K. : Induction

and isolation of vascular cells from human-induced pluripotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **29**: 1100-1103(2009)

2) 総 説

福原晶子, 山中伸弥: iPS 細胞による再生医療－基礎研究の進展と将来－(Advances in induced pluripotent stem cells(iPS cells)research). *THE LUNG perspectives.* **17**: 361-363(2009)

Belmonte, J.C., Ellis, J., Hochedlinger, K., Yamanaka, S.: Induced pluripotent stem cells and reprogramming: seeing the science through the hype. *Nat Rev Genet.* **10**: 878-883(2009)

Yamanaka, S.: Ekiden to iPS cells. *Nat Med.* **15**: 1145-1148(2009)

山中伸弥, 青井貴之, 佐藤俊哉: 分子生物学, 生化学, 細胞生物学における統計のポイント. 蛋白質核酸酵素. **54**: 1792-1801(2009)

山中伸弥: iPS 細胞の可能性と課題. 日本内科学会雑誌. **98**: 67-71(2009)

山本拓也, 山中伸弥: iPS 細胞の樹立からみた「遺伝子導入と核のリプログラミング」. *Medical Bio.* **6**: 34-39(2009)

吉田善紀, 山中伸弥: iPS 細胞(induced Pluripotent Stem cell)の産業的応用記述 Industrial applied technology of induced pluripotent stem cells : 103-108(2009)

石井哲也, 山中伸弥: 京都大学 iPS 細胞研究統合推進拠点. 再生医療. **8**: 284-288(2009)

Yamanaka, S.: Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature.* **460**: 49-52(2009)

Ohnuki, M., Takahashi, K., and Yamanaka, S.: Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology.* Chapter 4: Unit 4A.2.(2009)

坪岡則子, 山中伸弥: 4. 人工多能性幹細胞(iPS 細胞). 炎症・再生医学事典: 403-405(2009)

岩渕久美子, 山中伸弥: iPS 細胞. 治療学. **43**: 16-20(2009)

吉田善紀, 山中伸弥: iPS 細胞研究の進展. 医学のあゆみ. **229**: 675-678(2009)

Yamanaka, S.: A fresh look at iPS cells. *Cell.* **137**: 13-17(2009)

Daley, G. Q., Lensch, M.W., Jaenisch, R., Meissner, A., Plath, K., and Yamanaka, S.: Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell.* **4**: 200-201(2009)

Yamanaka, S.: Reconstruction of nuclear reprogramming by defined factors. *Systems Biology The Challenge of Complexity.* 239-242(2009)

沖田圭介, 山中伸弥: 幹細胞の特性と制御機構および作製技術－iPS 細胞(人工多能性幹細胞)－. 幹細胞の分化誘導と応用(2009)

沖田圭介, 山中伸弥: 人工多能性幹(iPS)細胞研究の現況. 最新医学. **64**: 487-496(2009)

山中伸弥: iPS 細胞の樹立～若い力がもたらした幸運. 細胞工学. **28**: 242-244(2009)

山中伸弥: 人. 日本医薬医事新報. **4419**: 27(2009)

山中伸弥: 整形外科から幹細胞研究へ. 証券奨学同友会報 2008. **33**: 1-3(2009)

青井貴之, 山中伸弥: 人工多能性(iPS)細胞の可能性と課題. *CLINICIAN.* **525**: 22-26(2009)

青井貴之, 山中伸弥: iPS 細胞が開く近未来の再生医療. 総合臨牀. **58**: 10-14(2009)

長船健二, 平家俊男, 山中伸弥: 超高速シーケンサーを用いた幹細胞研究の今後の展開. 実験医学. **27**: 26-31(2009)

八戸宏二郎, 山中伸弥: iPS テクノロジーによる体細胞の多能性誘導. *Medical Science Digest.* **35**: 7-8(2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

小柳三千代：microRNAs are actively involved in induction of pluripotent stem cells from mouse and human fibroblasts. 京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成 21 年度学術講演会(2009.12.14 京都)※ポスター発表

岩渕久美子：The Dissection of Reprogramming Process in Induced Pluripotent Stem Cells via ECAT11 Expression. 京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成 21 年度学術講演会(2009.12.14 京都)※ポスター発表

山中伸弥：科学的不正とは？－その定義と問題点－. 第 32 回日本分子生物学会年会「若手教育ランチョンセミナー 2009」(2009.12.10 横浜)

中川誠人, 瀧澤奈々子, 一阪朋子, 杉山逸未, 山中伸弥：Generation of safer iPS cells by factor X instead of c-MYC. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.10 横浜)※ポスター発表

高橋和利, 成田 恵, 與倉みどり, 一阪朋子, 山中伸弥：Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.10 横浜)※ポスター発表

青井貴之, 沖田圭介, 一阪朋子, 中川誠人, 小柳三千代, 八戸宏二郎, 田邊剛士, 高橋和利, 山中伸弥：Comprehensive analyses of chimeras and progeny mice from induced pluripotent stem cells. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.10 横浜)※ポスター発表

小柳三千代, 一阪朋子, 岡田亜紀, 成田 恵, 田邊剛士, 青井貴之, 沖田圭介, 高橋和利, 中川誠人, 山中伸弥：micro RNAs are actively involved in induction of pluripotent stem cells from mouse and human fibroblasts. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.10 横浜)※ポスター発表

岩渕久美子, 一阪朋子, 山中伸弥：The dissection of reprogramming process in induced pluripotent stem cells via ECAT11expression. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.10 横浜)※ポスター発表

田中孝之, 斎藤 潤, 中畑龍俊, 山中伸弥：Transgene silencing and global gene expression of iPS cells induced by retrovirus. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.10 横浜)※ポスター発表

田邊剛士, 一阪朋子, 山中伸弥：Enhancement of reprogramming efficiency by LIN28. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.10 横浜)※ポスター発表

Shimamoto, R.: Improvement of the quality of iPS cells by novel factors. Global COE International Symposium / Retreat 2009(2009.11.7 Awaji)※ポスター発表

Hong, H.: Increased generation efficiency of induced pluripotent stem cell by suppression of p53 in mouse and human. Global COE International Symposium / Retreat 2009(2009.11.7 Awaji)※ポスター発表

中村友紀, 中川誠人, 一阪朋子, 塩田有史, 山中伸弥：初期胚で高発現する ECAT15-2 は肺と腎臓の発生に重要な役割を担うが, 初期胚の発生に必須ではない. 第 82 回日本生化学会大会(2009.10.22 神戸)※口頭およびポスター発表

Tanabe, K.: Detailed analysis of reprogramming factors. JSPS, Sweden – Japan Joint Colloquium. Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology(2009.9.5 Sweden)

Ohnuki, M.: An efficient assessment of the safety of induced pluripotent stem cells. JSPS, Sweden – Japan Joint Colloquium. Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology(2009.9.5 Sweden)

- Tanaka T.: Reproducing the pathogenesis of CINCA syndrome in vitro with patient- specific iPS cells. JSPS, Sweden – Japan Joint Colloquium. Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology (2009.9.5 Sweden)
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Nakagawa, M., Okita, K., Yamanaka, S.: Increased generation efficiency of induced pluripotent stem cell by suppression of p53 in mouse and human. 7th ISSCR Annual Meeting (2009.7.10 Spain) ※ポスター発表
- Nakamura, T., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Shiota, A., Yamanaka, S.: ECAT15-2 plays important roles for lung and kidney organogenesis but dispensable for early development. 7th ISSCR Annual Meeting (2009.7.10 Spain) ※ポスター発表
- Iwabuchi, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S.: Functional analysis of ECAT11 (L1TD1) in mouse embryonic stem cells and its utilization as a novel marker of induced pluripotent stem cells. 7th ISSCR Annual Meeting (2009.7.10 Spain) ※ポスター発表
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H., Yamanaka, S.: Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. 7th ISSCR Annual Meeting (2009.7.9 Spain) ※ポスター発表
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S.: Hypoxia significantly enhances the generation of induced pluripotent stem cells. 7th ISSCR Annual Meeting (2009.7.9 Spain) ※ポスター発表
- Aoi, T., Okita, K., Ichisaka, T., Tanabe, K., Koyanagi, M., Takahashi, K., Nakagawa, M., Yamanaka, S.: Long term observation of iPS cells-derived mice. 7th ISSCR Annual Meeting (2009.7.9 Spain) ※ポスター発表
- Koyanagi, M., Ichisaka, T., Okada, A., Narita, M., Tanabe, K., Aoi, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Yamanaka, S.: microRNAs are actively involved in induction of pluripotent stem cells from mouse and human fibroblasts. 7th ISSCR Annual Meeting (2009.7.9 Spain) ※ポスター発表
- Miura, K.: Neural differentiation and therapeutic effects of induced pluripotent stem cell. The Fourth iCeMS International Symposium (2009.5.27 Kyoto) ※ポスター発表
- Tanabe, K.: The effect of Lin28 in generation of iPS cells. The Fourth iCeMS International Symposium (2009.5.27 Kyoto) ※ポスター発表
- Hong, H.: Increased efficiency of induced pluripotent stem cell induction by suppression of p53. The Fourth iCeMS International Symposium (2009.5.27 Kyoto) ※ポスター発表
- Nakamura, T.: Functional analysis of ECAT5-1 and ECAT15-2 in ES cells. The Fourth iCeMS International Symposium (2009.5.27 Kyoto) ※ポスター発表
- 山中伸弥: iPS細胞がつくる新しい医学. 再生医療の実現化プロジェクト第1回公開シンポジウム (2009.1.30 東京)
- 大貫茉莉: 異なる2種類の遺伝子セットを用いたマウス人工多能性幹細胞の誘導/体細胞の不完全なリプログラミングに関する研究. 京都大学再生医科学研究所 2008年度若手研究発表会 (2009.1.16 京都)

2) 講演・シンポジウム

- 山中伸弥, 青井貴之: iPS細胞研究はどこまで来たか? 再生医療の応用を見据えて, 「BTJ プロフェッショナルセミナー」 (2009.12.21 東京)

- 山中伸弥：Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「第 32 回日本分子生物学会年会」(2009.12.9 横浜)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「九日会」(2009.12.9 東京)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「The Stem Cell Director's Seminar at the University of California at Berkeley」(2009.12.2 U.S.)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「国立大学附置全国共同利用研究所「研究センター協議会第 6 回総会」」(2009.11.27 京都)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「奈良先端科学技術大学院大学講演」(2009.11.26 奈良)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「京都大学産官学連携講演会」(2009.11.20 東京)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「The 80th Anniversary of Canada-Japan Relations – “The Imperative for Strengthening Innovation”」(2009.11.17 Tokyo)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「Gairdner Awardees Lecture」(2009.10.29 Canada)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「Gairdner/ McEwen Symposium Stem cells, disease mechanisms and future therapies」(2009.10.28 Canada)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「第 71 回日本血液学会学術集会」(2009.10.24 京都)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「第 82 回日本生化学学会大会」(2009.10.23 神戸)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「JDDW2009 第 51 回日本消化器病学会大会」(2009.10.16 東京)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「Ontario Stem Cell Seminar at BIO Japan 2009」(2009.10.9 Tokyo)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「Bio Japan 2009 ~World business Forum」(2009.10.9 Tokyo)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, (Plenary Session 200 “Science and Technology for Global Health”) 「STS Forum 6th Annual Meeting」(2009.10.5 Kyoto)
- 山中伸弥：iPS 細胞による再生医療の課題, 「厚生科学審議会科学技術部会 第 5 回ヒト幹細胞を用いる臨床に関する指針の見直しに関する専門委員会」(2009.9.24 東京)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「日本せきずい基金創立 10 周年記念「国際シンポジウム Walk Again 2009」」(2009.9.19 Tokyo)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「第 9 回北里・ハーバードシンポジウム」(2009.9.12 東京)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「JSPS, Sweden – Japan Joint Colloquium. Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology」(2009.9.5 Sweden)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「EMBO Meeting 2009」(2009.9.1 Netherlands)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「IUBMB 2009 Congress/ The Chinese Society of Biochemistry and Molecular Biology (CSBMB)」(2009.8.7 Shanghai)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「財団法人実験動物中央研究所 平成 21 年度学術懇話会」(2009.8.6 東京)
- 中川誠人：iPS 細胞の再生医療への応用 = iPS 細胞研究の現状と課題 = 「第 25 回創薬セミナー」(2009.7.29 山梨)
- 中川誠人：臨床応用へ向けた iPS 細胞研究の現状 (iPS cell research for clinical application), 「京都大学化学研究所 所セミナー」(2009.7.23 京都)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題, 「日本経済研究センター講演」(2009.7.23 東京)
- 中川誠人：iPS 細胞研究の現状と今後の展開, 「アジレントテクニカルセミナー～高感度化で変わるマイクロアレイの活用法」(2009.7.15 大阪)

- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「大阪教育大学附属高校天王寺校舎 スーパーサイエンスハイスクール」
(2009.7.13 大阪)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「ISSCR 7th Annual Meeting」(2009.7.11 Spain)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「The 9th World Congress on Inflammation」(2009.7.6 Tokyo)
- 山中伸弥：iPS細胞の今後の展望～iPS細胞の可能性を未来へ～，「アクティブライフ 20周年記念講演会」(2009.7.3 大阪)
- 山中伸弥：iPS細胞がつくる新しい医学，「社会福祉法人晴朗会講演会」(2009.6.20 大阪)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「EMBO Conference Advances in Stem Cell Research」(2009.6.17 U.K.)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「JST-CIRM Workshop」(2009.6.8 U.S.)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「第52回日本腎臓学会学術総会」(2009.6.5 横浜)
- 山中伸弥：iPS細胞がつくる新しい医学，「セコム科学技術振興財団設立30周年記念講演会」(2009.6.5 東京)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「第179回生命科学フォーラム」(2009.6.4 東京)
- 山中伸弥：iPS細胞がつくる新しい医学，「第22回全国経済同友会セミナー」(2009.5.23 北海道)
- 山中伸弥：iPS細胞がつくる新しい医学，「SMA 家族の会」(2009.5.16 京都)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「第82回日本整形外科学会学術総会」(2009.5.15 福岡)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「神戸先端医療カンファレンス」(2009.5.8 神戸)
- 山中伸弥：世界最高レベル研究センターへの挑戦，「自由民主党科学技術創造立国推進調査会・研究開発成果実用化推進PT 合同会議」(2009.4.16 東京)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「第106回日本内科学会講演会」(2009.4.10 東京)
- Yamanaka, S.: iPS cells - Perspective and Challenge, 「Seminar at Shantou University Medical College」(2009.4.2 China)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「Seminar at University of Massachusetts Medical School」(2009.3.27 U.S.)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「2009 Rosenstiel Award」(2009.3.26 U.S.)
- Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「Seminar at New York University Medical School」(2009.3.20 U.S.)
- Yamanaka, S.: iPS Cells - Perspective and Challenge, 「The Harvey Lecture Series 2009」(2009.3.19 U.S.)
- 山中伸弥：体細胞の初期化による多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立，「第2回江橋節郎賞受賞講演」(2009.3.17 横浜)
- 山中伸弥：多能性幹細胞の維持と誘導，「平成20年度上原賞受賞者記念講演」(2009.3.11 東京)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「第8回日本再生医療学会」(2009.3.5 東京)
- 中川誠人：iPS細胞誘導のメカニズムの解明，「第8回日本再生医療学会」(2009.3.5 東京)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「第5回宮崎サイエンスキャンプ」(2009.2.21 宮崎)
- 山中伸弥：人工多能性幹細胞による生体反応予想，「第28回島津賞受賞記念講演」(2009.2.19 京都)
- 山中伸弥：iPS細胞の開発と可能性－科学技術の国際競争力を考える－，「G1サミット」(2009.2.14 福島)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「第5回日本消化管学会総会学術集会」(2009.2.13 東京)
- 山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題，「第5回慶応義塾先端科学技術シンポジウム」(2009.2.4 東京)

山中伸弥：iPS 細胞の現況と今後の展望，「2009 ライフサイエンス知財フォーラム」(2009.1.28 東京)

中川誠人：Induced Pluripotent Stem(iPS)Cell and Stem-cell Therapy，「第3回日仏先端科学シンポジウム」
(2009.1.24 神奈川)

山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学，「再生医療を推進する議員の会」(2009.1.22 東京)

Yamanaka, S.: Induction of Pluripotency by Defined Factors, 「Regenerative Medicine(ReMS)Seminar Series, Stanford University」(2009.1.15 U.S.)

山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題，「千里ライフサイエンスセミナー」(2009.1.9 大阪)

再生増殖制御学分野 Department of Growth Regulation

分野主任 教授 瀬原(藤沢)淳子

Prof. Atsuko Sehara (Fujisawa)

【研究概要】

発生や再生過程では，細胞間シグナルの産生や応答性，あるいは細胞接着などが時間的あるいは空間的に制御されることによって秩序ある形作りや再生が進行する．そのようなシグナリングや接着のオン・オフは，転写レベルだけでなく様々な転写後制御機構によって時間的・空間的チューニングを受けていると考えられる．現在，我々はそのような細胞間シグナリング・接着の制御機構としてのプロテアーゼ制御，特に膜型シグナル分子や接着因子の切断を介して細胞間相互作用に関与する，ADAM と呼ばれる膜型プロテアーゼファミリーに着目した研究を行っている．これまでは，主にマウスを用いて ADAM プロテアーゼの研究を行ってきた．しかし，高等動物を用いた細胞間相互作用の研究から解明されることには限界があった．それは我々が解析しようとする発生ステージなどでは器官や組織がすでに非常に大きく，個々の細胞の挙動やその中の蛋白質の動きを観察するには大きな困難を伴うからである．そこで我々はそのような限界を打破すべく，数年前から，ゼブラフィッシュを用いた細胞間シグナリングや ADAM プロテアーゼの研究を開始した．今回は，我々の研究室でゼブラフィッシュを用いた研究の立ち上げにも大きく貢献してきた飯田敦夫 GCOE 博士研究員を中心とするプロジェクトについて紹介する．

飯田と瀬原は，蛇毒の進化に着目した．蛇毒出血因子・血液凝固阻止因子は構造的に ADAM に良く似た可溶性蛋白質であることから，ほ乳類や魚類にもその祖先遺伝子としての膜型 ADAM が存在するのではないか．また，出血因子・血液凝固因子の祖先遺伝子は，血管形成や血液凝固の制御に関与しているのではないかと．心血管系においては，すでに Kuzbanian/ADAM10 が血管形成に関与していることが報告されており，我々もメルトリン β /ADAM19 が心臓形成に関与することを明らかにしている．それに対して，血液における ADAM の役割や機能は解明されていない．そこで我々は，まず，ヒトやマウスの EST データベースをサーチして，どの ADAM が血液で発現しているかを調べた．その結果，血液や造血組織に局限して高発現を示す ADAM 遺伝子を見つけることができた．ゼブラフィッシュでも，そのオーソログの zADAM が造血組織である腎臓で限局的に発現していた．そこで，血管形成・血液循環における zADAM の役割を調べることを目的に，血管と赤血球をそれぞれ GFP と RFP

でモニターできるトランスジェニックゼブラフィッシュ Fli-GFP/GATA1-RFP(川原敦雄博士より供与)を用い、生きたゼブラフィッシュ胚における血液循環を観察した。その結果、血液循環の開始時には、胚の中で予想外のことが起こっていることがわかってきた。最初に循環する一次赤芽球は、血管形成の際は血管外に待機しており、背側大動脈と大静脈の形成に伴って血管内に移動しはじめる。血管内に移ったこれら個々の赤芽球は、心臓の鼓動が始まっても、すぐには循環し始めない。そして殆どの血球が血管内に移動したとき、それらの血球は同調的に血液循環を開始するのである。脊椎動物において、血管と赤芽球をラベルしこのような血液循環開始の瞬間を捉えたのは、本研究が初めてである (Fig. 1)。

受精卵にアンチセンスモルフォリーノオリゴを注入して zADAM の発現をノックダウンすると、背側大動脈と大静脈は形成され血漿も流れるが、赤芽球が血管内に蓄積し、血液循環が開始しないことがわかった (Fig. 2)。ノックダウンの程度によって、血管形成と心臓の鼓動に依存する血漿の流れに加えて一部の血球は循環を開始するものの、一部は蓄積するような、同調的な血液循環開始が乱される個体も見られた。また、GATA-1 プロモーター下で zADAM のプロテアーゼ活性部位変異体を発現すると、それが dominant-negative 効果を示し、その赤芽球は循環せずに蓄積したことから、赤芽球における zADAM のプロテアーゼ活性が必要であることがわかった。さらに、心臓内にメタロプロテアーゼインヒビターをインジェクトすると同様の赤芽球の蓄積が見られることから、血液循環開始にはプロテアーゼ活性が血管内で必要であることも示された。一方、トロポニン T をノックダウンして心臓の鼓動を止めると、この場合は血球の循環だけでなく血漿の流れも阻害されたことから、赤血球の循環には血漿のフローと血球に発現する zADAM の両方が必要であることがわかった。培養細胞を用いた実験で zADAM は、ほ乳類では多くの血球で発現する接着因子でムチン様膜蛋白質の PSGL1 を切断する活性を有した。これらのことから、zADAM は一次赤芽球が、PSGL1 あるいは類似の接着因子の切断によって血管から離れて循環を開始するために必要なプロテアーゼであることが示唆された。

現在のところ、赤芽球の循環がどのような機構によって同調的開始を実現するかは未解明である。ある閾値以上の血漿のフローにより zADAM による接着因子の切断活性化が起こる可能性も含め、この現象に関してはさらなる研究が必要である。また、ほ乳類の血液循環開始において類似の機構が働いているか、これも今後の課題である。

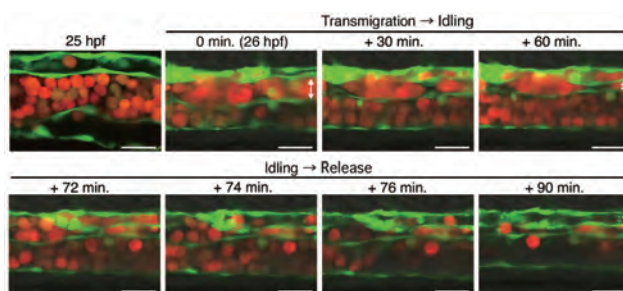


図1 胚発生における血液細胞の循環は同調的に開始する血管を GFP (Fli:GFP), 血球を RFP (GATA1:RFP) でラベルしたゼブラフィッシュ胚を用いて、赤血球がどのように循環を開始するかを詳細に観察し、血球の循環開始の瞬間を、ライブイメージングにより捉えることに成功した。その結果、赤血球の循環は、(1)心臓の拍動・血管形成のプロセスと密接にリンクしているが、心臓の拍動による血漿の循環より遅れて開始する、(2)大動脈腹側に集積した赤血球前駆細胞は、transmigration によって次々に大動脈内に出現するが、(3)個別に循環を開始するのではなく、ある時期にほぼ同調的に循環を開始する、という厳密に制御されたプロセスであることが明らかになった。

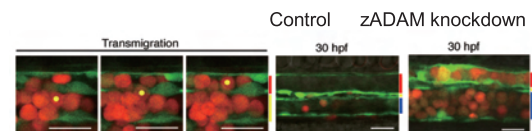
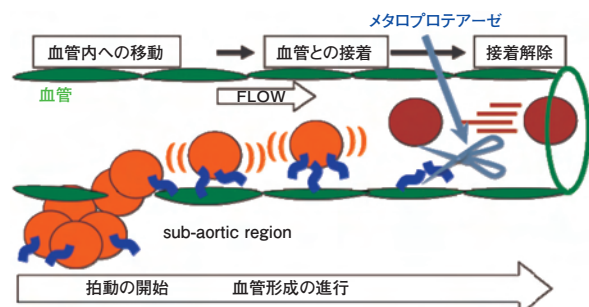


図2 血液循環開始は膜型メタロプロテアーゼ zADAM を必要とする

アンチセンスモルフォリーノ注入により zADAM の発現を抑制すると、赤血球前駆細胞の血管への移動は起こるが、循環開始が抑制された。zADAM 欠損胚では、心臓の拍動開始や体幹の動静脈の形成、血漿の循環はコントロール胚と同様に起こることが確認できたが、血球と血管の接着が解除されず、種々のレベルで血管内に血球が蓄積した。



Development and regeneration require various kinds of intercellular signaling and adhesion molecules. Many intercellular signaling molecules are generated as membrane-anchored proteins, and they are subjected to proteolytic processing to liberate their extracellular domains (ectodomain shedding). Our research has been focused on regulatory roles of ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) family proteins in such cell-cell interactions and the ectodomain shedding. Evidence suggests that ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) family proteases are involved in the ectodomain shedding of various membrane proteins, and participate in developmental processes and diseases. Meltrin beta (ADAM19), for example, plays a role in the ectodomain shedding of membrane-anchored growth factor neuregulin/ glial growth factor, and participates in the multiple processes including heart development, formation of neuromuscular junction, and Schwann cell differentiation during regeneration. Here we would like to present a novel role of an ADAM protease during development.

The primitive blood, the first The earliest blood is generated in blood islands in the yolk sac of mammals and in the and an intra-embryonic structure called as the intermediate cell mass (ICM) in teleosts. However, mechanisms How the first the blood enters the circulation from these structures is largely unknown. In this study, we By monitoring RFP- and GFP-labeled blood precursors and blood vessels, respectively, here we show that the onset of blood circulation occurs synchronously in the live zebrafish (*Danio rerio*). This synchrony is achieved by retention of erythroid precursors on the lumen of blood vessels after transmigration transmigration from the sub-aortic region one after another, and then, by almost simultaneous release of these precursors into the plasma flow. The latter process requires zADAM, a member of a disintegrin and metalloprotease (ADAM) family. Biochemical analyses suggest that cell adhesion molecules such as P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) are substrates of zADAM. We propose that proteolysis-dependent detachment of blood precursors from blood vessels triggers the onset of blood circulation.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Sakurai, H., Inami Y., Tamamura, Y., Yoshikai, T., Sehara-Fujisawa, A., Isobe, K.. Bidirectional induction toward paraxial mesodermal derivatives from mouse ES cells in chemically defined medium. *Stem Cell Res.* **3**(2-3): 157-169. (2009)
- Mino N, Miyahara R, Nakayama E, Takahashi T, Takahashi A, Iwakiri S, Sonobe M, Okubo K, Hirata T, Sehara A, Date H.: A disintegrin and metalloprotease 12(ADAM12) is a prognostic factor in resected pathological stage I lung adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* **100**(3): 267-72. (2009)
- Wakatsuki, S., Yumoto, N., Komatsu, K., Araki, T., Sehara-Fujisawa, A.: Roles of meltrin beta /ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration. *J Biol Chem.* **284**(5): 2957-66. (2009)

2) 総説

瀬原淳子：ADAM プロテアーゼによるシェディングの謎(特集に当たって), 特集「膜蛋白質のシェディングとそ

の制御機構を探る」(編集：瀬原淳子), PNE(蛋白質拡散酵素), 共立出版, **Vol.54 No.13**(10月号)(2009)

若月修二, 湯本法弘, 瀬原淳子: 神経系の細胞間シグナル伝達におけるメルトリン β の多面的な役割, 特集「膜蛋白質のシェディングとその制御機構を探る」(編集：瀬原淳子), PNE(蛋白質拡散酵素), 共立出版, **Vol.54 No.13**(10月号)(2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Norihiro Yumoto, Shuji Wakatsuki, and Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of Meltrin beta/ADAM19 in Formation of Neuromuscular Junction. CDB シンポジウム 2009 「Shape and Polarity」(2009.3.23 神戸)

Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of Meltrin beta/ADAM19 in Formation of Neuromuscular Junction. The 8th French-Japanese Workshop on Molecular Dystrophy (2009.7.3 Paris, France)

Atsuo Iida, Hidetoshi Sakurai, Kouji Komatsu, Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of ADAM protease Meltrin β (ADAM19) in the circulatory organ development. International Society for Stem Cell Research 7th Annual Meeting (2009.7.8 Barcelona, Spain)

Atsuko Sehara Fujisawa: Role of meltrins and cardiovascular morphogenesis. Gordon Research Conference –Matrix Metalloprotease – (2009.9.1 Les Diablerets, Switzerland)

岩木 彩, 飯田敦夫, 瀬原淳子: 膜型プロテアーゼ ADAM により制御される血液循環の開始はプロテアーゼ阻害剤の血管内投与により抑制できる, 第 15 回小型魚類研究会 (2009.9.12 名古屋)

飯田敦夫, 坂口和弥, 佐藤洋旭, 岩木 彩, 瀬原淳子: 胚発生における最初の血液循環は, 血管内腔への赤血球の移動とプロテアーゼによる細胞接着の解除により開始する, 第 15 回小型魚類研究会 (2009.9.12 名古屋)

桜井英俊, 坂口泰子, 酒井大史, 庄子栄美, 花岡和則, 瀬原淳子: 筋ジストロフィーモデルマウスを用いたマウス iPS 細胞由来中胚葉前駆細胞移植治療の試み, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究」班会議 (2009.12.4 東京)

桜井英俊, 坂口泰子, 酒井大史, 庄子栄美, 瀬原淳子: Functional Skeletal Muscle Regeneration by the Engraftment of Mesodermal Progenitors Derived from Mouse iPS Cells. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.10 横浜)

坂口泰子, 桜井英俊, 庄子栄美, 瀬原淳子: Establishment of inducible system for differentiating mouse iPS cells into myogenic progenitor cells in chemically defined condition. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.10 横浜)

飯田敦夫, 坂口和弥, 佐藤洋旭, 岩木 彩, 瀬原淳子: Intravascular Proteolysis Triggers Synchronous Start of Blood Circulation in Zebrafish. ワークショップ「A new era of genetic studies on vertebrate organogenesis (脊椎動物器官形成研究の新展開)」(オーガナイザー: 川上浩一, 日比正彦), 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.11 横浜)

飯田敦夫, 坂口和弥, 佐藤洋旭, 岩木 彩, 瀬原淳子: Intravascular proteolysis triggers synchronous start of blood circulation in zebrafish. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.11 横浜)

佐藤洋旭, 飯田敦夫, 瀬原淳子: ADAM8 is an Active Metalloprotease That Can Shed the Ectodomain of PSGL-1. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.11 横浜)

飯田敦夫, 坂口和弥, 佐藤洋旭, 岩木 彩, 川原敦雄, 瀬原淳子: 胚発生における最初の血液循環にはメタロプロテアーゼによる細胞接着の解除が必要である. 再生医科学研究所学術講演会 (2009.12.14 京都)

Takahiko Sato, Didier Rocancourt, Solveig Thorsteinsdottir, Margaret Buckingham: Identification and analysis of Pax3 targets that regulate the behaviour of skeletal muscle stem cells in the dorsal somite. 再生医科学研究所学術講演会(2009.12.14 京都)

桜井英俊, 坂口泰子, 酒井大史, 庄子栄美, 瀬原淳子: Functional Skeletal Muscle Regeneration by the Engraftment of mesodermal progenitors derived from mouse iPS cells. 再生医科学研究所学術講演会(2009.12.14 京都)

2) 講演・シンポジウム

瀬原淳子, 佐藤文規, 飯田敦夫, 佐藤智美: ゼブラフィッシュの筋維持における ErbB リガンド・ニューレグリンの役割. 宇宙利用シンポジウム(第25回)(2009.1.15 相模原)

瀬原淳子: ゼブラフィッシュを用いた細胞外環境の研究. 2009 NIG Zebrafish Meeting(2009.3.18 三島)(招待講演)

再生免疫学分野 Department of Immunology

准教授 喜納 辰夫

Assoc. Prof. Tatsuo Kina

【研究概要】

本研究分野では, (1)マウス胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫における Notch1 遺伝子 5'領域欠損の解析および(2)BALB/c.CD45.1 マウスモデルにおける CD45 分子によるリンパ球活性化調節機構を主なテーマとして研究を行っている。

1. マウス胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫における Notch1 遺伝子 5'領域欠損の解析

マウスに放射線を照射したり環境化学物質を投与したりすると, その胸腺はいったん著しく萎縮する。その後骨髄から幹細胞が供給されるとともに, 残存した胸腺細胞の分化・増殖により, 胸腺は臓器として再生する。しかし再生の過程で, 高い頻度で胸腺リンパ腫が生じる。X線照射で誘導した胸腺リンパ腫の42%(25/60)において, Notch1 遺伝子 5'特定領域の欠損が生じていることを, これまでにわれわれはPCRで確認している。Notch1は正常な胸腺細胞の分化に重要で, 上記の遺伝子欠損がおこれば恒常的に増殖シグナルが入ると考えられる。今年度はまず, 環境化学物質 ENU で誘導した胸腺リンパ腫における Notch1 遺伝子 5'領域欠損の有無を調べた。その結果意外にも, ENU 誘導胸腺リンパ腫のほぼ半数から(24/51)欠損を検出した。すなわち, Notch1 遺伝子 5'領域欠損が放射線誘発胸腺リンパ腫に特有ではないことを明らかにした。次に欠損の生じた対立遺伝子の割合を real time PCR で調べたところ(図1), 多くの場合すべての細胞は一方の対立遺伝子で欠損がおこっていた。しかしながら一部の胸腺リンパ腫では, 欠損を持つ細胞とまったく持たない細胞が共存していた。このことは, 腫瘍細胞の増殖過程で Notch1 遺伝子 5'領域の欠損が生じたことを示している。今後は, Notch1 遺伝子 5'領域欠損とそれ以外の領域における発がん性突然変異との関係について解析を進める。

2. BALB/c.CD45.1 マウスモデルにおける CD45 分子によるリンパ球活性化調節機構

造血系細胞に特異的に発現される CD45 は、細胞外ドメインに受容体構造を持ち、細胞質内ドメインにはチロシンリン酸特異的脱リン酸化酵素(PTPase)活性を有する膜タンパク質であり、リンパ球の発生・分化や抗原刺激後の活性化を調節する因子として重要であると考えられている。しかしながら、その幅広い機能やリンパ球活性化における詳細な役割、そのリガンドについてはいまだに未知の点が多い。我々は、本研究室で樹立した BALB/c.CD45.1 マウスが、通常の BALB/c マウス(CD45.2)と比較して、高頻度で、頭や背中の皮膚炎、アレルギー性結膜炎や中耳炎を発症することを報告してその原因を解析してきた。その過程で、BALB/c.CD45.1 マウスにおけるこれらの免疫異常は、生体レベルでは Th2 サイトカインの亢進や IgE 産生異常、細胞レベルでは T 細胞や B 細胞の活性化亢進が認められ、原因がリンパ球活性の調節異常によると思われることが分かった。リンパ球活性化に重要なシグナル伝達系分子の解析から、CD45.1 マウスでは、CD45.2 マウスに較べて、リンパ球表面の CD45 分子の PTPase 活性が年齢とともに有意に低下していることが示され、CD45.1 マウスにおける免疫異常の原因が、リンパ球活性化の調節異常であることが示唆された。また、抗 CD45 抗体を用いて T 細胞や B 細胞表面の CD45 分子を架橋すると、PTP 活性が顕著に低下することから、細胞表面の CD45 分子のダイマー形成が CD45 分子そのものの PTPase 活性低下の原因になっていることが判明した。これらの解析結果から、CD45 分子は、抗原刺激後のリンパ球活性化を正常にするために重要な役割を持ち、過剰な免疫反応の持続を抑制して、アレルギーや自己免疫の発症を制御していると考えられる(図2)。

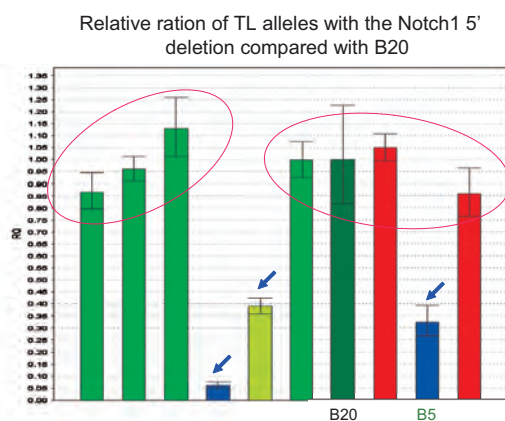


図1 1頭のマウスに発生した胸腺リンパ腫であるにもかかわらず一部の細胞でのみ Notch1 遺伝子 5'領域に欠失していたものが存在していた。PCR で Notch1 遺伝子 5'領域欠失を検出できた胸腺リンパ腫の多くのものについては、すべての細胞の一方の対立遺伝子に欠失が生じていた。しかしながら矢印で示した胸腺リンパ腫では、欠失を持つ細胞とまったく持たない細胞がともに存在していると考えられる。

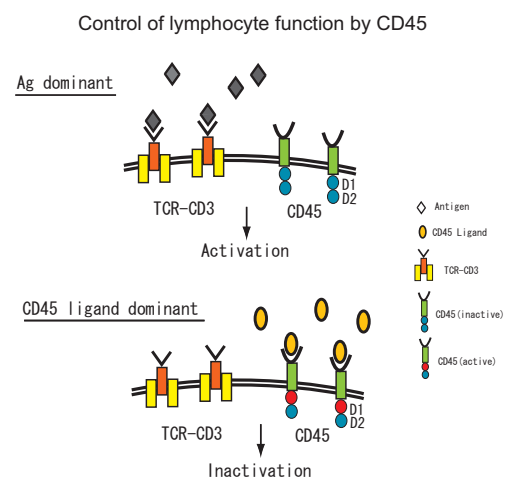


図2 CD45 分子によるリンパ球活性調節のモデル。抗原過剰域では、抗原刺激によりリンパ球が活性化するが、ある程度活性化が進み、CD45 リガンドが過剰になると、CD45 の PTPase によりシグナル伝達系分子の脱リン酸化(非活性化)が起こってリンパ球が正常に戻る。BALB/c.CD45.1 マウスではこの過程で異常が起こる。

Our research aim focuses on two areas. (1) Analysis of a deletion at the 5' region of the Notch1 gene among murine thymic lymphomas that are highly formed during regeneration of atrophied thymi and (2) Mechanism of the control of lymphocyte function by CD45 in BALB/c.CD45.1 mouse model.

1. Analysis of a deletion at the 5' region of the Notch1 gene among murine thymic lymphomas that are highly formed during regeneration of atrophied thymi

Irradiation or administering a mutagen to mice causes atrophy of their thymi. Normally, immigrating stem cells from bone marrow and intensive proliferation and differentiation of survived thymocytes regenerate the thymus. However, malignant proliferation is often observed during this process. Our PCR analysis has recognized a specific deletion at the 5' region of the Notch1 gene from 25 of 60 thymic lymphomas induced by X-ray irradiation. Notch1 is indispensable for the normal differentiation of thymocytes and the deletion is expected to result in constitutive growth. This year, we first examined ENU-induced thymic lymphomas for the 5' deletion of the Notch1 gene and found that nearly half of them (24/51) possessed it, indicating that the deletion is not necessarily specific to irradiation-induced thymic lymphomas. Next we revealed that the portion of the alleles with the deletion by real time PCR (Fig. 1). In many lymphomas all the cells had a normal allele and a deleted allele. Nevertheless, some lymphomas consisted of cells with two normal alleles and cells retaining a deleted allele. The latter cases show that the region was deleted after the start of the tumorigenic expansion. As a next step, we are going to investigate the relationship between the deletion and other oncogenic mutations at the Notch1 gene.

2. Mechanism of the control of lymphocyte function by CD45 in BALB/c.CD45.1 mouse model.

CD45 is specifically expressed in hematopoietic cells and carries the transmembrane receptor-type structures in the extra-membrane domains as well as the phosphotyrosine-specific phosphatase (PTPase) activities in its transmembrane domain. The function of CD45 is considered to be important in the development/differentiation of hematopoietic cells and the control of lymphocyte activation after antigen stimulations. However, the wide variety of its functions and the molecular mechanism of the functions as well as its ligand(s) are still unclear. The BALB/c.CD45.1 congenic mice which we established in our laboratory spontaneously develop atopic dermatitis in skins as well as allergic inflammatory diseases in eyes and ears after 6 months of age, and the occurrence of these disorders are depend upon the hyper production of Th2 cytokines and IgE in the blood. Biochemical analysis revealed that tyrosine phosphorylation of signaling molecules such as Jak3/Stat6 in lymphocytes in aged BALB/c.CD45.1 mice was significantly higher than that in normal BALB/c mice, suggesting that the disfunction of control mechanism of lymphocyte activation causes the diseases in BALB/c.CD45.1 mice. Because the activation of Jak3/Stat6 is indispensable for lymphocyte activation, and CD45 is involved in the regulation of Jak3/Stat6, our results suggest that PTPase activity of CD45 in aged BALB/c.CD45.1 lymph node B-cells is reduced as compared to normal BALB/c B-cells. Using the assay method that directly quantitate the PTP activity of CD45 molecules, we demonstrated that PTPase activity of CD45 molecules in aged BALB/c.CD45.1 mice was significantly lower than that in normal mice and the cross-linking of CD45 molecules in lymphocyte membrane caused the decreased PTPase activities of CD45, suggesting that disfunction of the control mechanism in lymphocyte functions might be involved in the occurrence of immune disorders in BALB/c.CD45.1 mice (Fig 2).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Tokuriki, A., Iyoda, T., Inaba, K., Ikuta, K., Fujimoto, S., Kumakiri, M. Yokota, Y.: Dual role for Id2 in chemical carcinogen-induced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* **30**: 1645-1650 (2009)

2) 著 書

喜納辰夫：免疫と生体防御。「医学のための細胞生物学」(永田和宏，塩田浩平共編，南山堂，東京)291-292(2009)

◆ 学会等の発表 ◆

学会・研究会

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, SHIMADA Yoshiya: An example of negative selection during thymic lymphomagenesis. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (2009.6.1-4. 京都)

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, KINA Tatsuo, SHIMADA Yoshiya: Murine thymic lymphomas composed of two subpopulations: undifferentiated cells and differentiated cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (2009.12.2-4. 大阪)

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, KINA Tatsuo, SHIMADA Yoshiya: Analysis of TCR β loci in murine thymic lymphomas induced by X-ray irradiation indicates that efficient TCR β gene V to DJ rearrangement has occurred. 第32回日本分子生物学会年会 (2009.12.9-12. 横浜)

藤本真慈，柿沼志津子，島田義也：胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫における Notch1 遺伝子部分欠損の解析. 京都大学再生医科学研究所平成 21 年度学術講演会 (2009.12.14. 京都)

再生医学応用研究部門

生体修復応用分野 Department of Biological Repair

分野主任 准教授 高橋 淳

Assoc. Prof. Jun Takahashi

【研究概要】

我々は、胚性幹細胞(ES細胞)と人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた神経難病治療法開発を目指している。なかでも、胎児黒質細胞移植によって臨床経験が蓄積されているパーキンソン病を主な対象疾患として、ドーパミン産生神経の誘導、細胞移植による神経症状の改善に関する研究を行っている。この細胞移植療法においては、効率的な神経誘導、腫瘍形成抑制のための細胞選別、移植細胞の生存維持、長期効果と安全性の確認など検討すべき点が多々あり、現在はこれらをひとつひとつ解決している。将来的には、細胞移植や脳深部刺激療法などを含めた総合的な神経難病治療に繋げたいと考えている。

2009年はホスト脳環境に着目し、マトリゲルとの同時移植でマウスES細胞由来神経前駆細胞の生着やドーパミン産生神経への分化が促進されることを報告した(図1)。その機序として、マトリクスとしての足場効果以外に炎症細胞の浸潤抑制効果も示唆された。今後はマトリクスを供給すると同時に神経栄養因子や炎症抑制因子の徐放を検討している。また、MPTP投与で作製した霊長類パーキンソン病モデルへの移植では未分化ヒトES細胞の残存が腫瘍形成の原因となることを明らかにし、現在この腫瘍の解析を進めている。

We are developing a cell replacement therapy for the neurological disorders by using stem cells, especially embryonic stem cells (ES cells) and induced pluripotent stem cells (iPS cells). The main target is Parkinson's disease, and our research focuses on induction of dopaminergic (DA) neurons from these cells and transplantation of the cells into the brain to improve neurological symptoms. So far, we have demonstrated that transplantation of monkey ES cell-derived neurons improved the Parkinsonian symptoms of the monkey models. In addition, we have

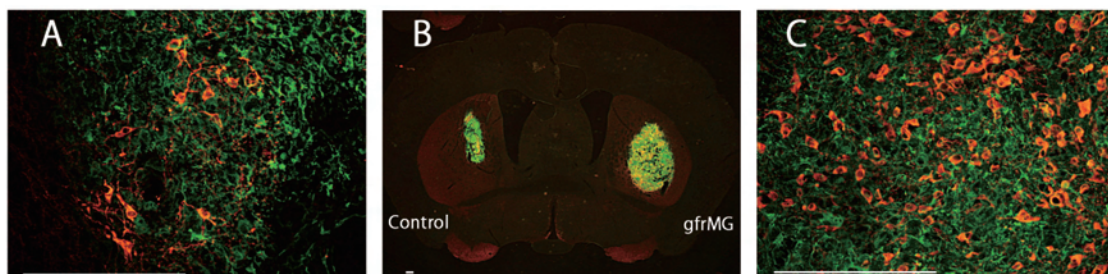


図1 マウスES細胞由来神経前駆細胞のマトリゲルとの脳内同時移植。4週間後の免疫染色では移植片のサイズ、生着したTH陽性細胞(赤色)数とも細胞単独移植と比べて増加していることが確認された。

Fig. 1 Transplantation of ES cell-derived NPCs with or without gfrMG. Mouse ES cell-derived NPCs were grafted with (B right, C) or without (A, B left) gfrMG. Immunohistochemistry four weeks after transplantation shows that grafted cells (green in A-C) survived in the striatum, and that some differentiated into TH-positive DA neurons (red in A-C). The graft volume and the number of TH-positive cells per graft were significantly larger with gfrMG. Scale bar=200 μ m.

revealed a method to prevent tumor formation. Now, we are inducing DA neurons from human ES and iPS cells, and developing a safe and efficient method for clinical application of these cells.

In 2009, we have reported that growth factor-reduced matrigel (gfrMG) supported survival and DA differentiation of mouse ES cell-derived neural progenitor cells in the mouse brain (Fig. 1). It not only provided scaffold for the cell survival but also prevented inflammatory cells to invade into the graft. We think this approach is useful and we are developing a bio-matrix system which secretes neurotrophic factors and/or inhibitors of surrounding inflammation. We have also revealed that human ES cells can cause tumor formation in the brain of MPTP-treated monkeys. We are now investigating the histology of these tumors.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Uemura M, Refaat M. M, Shinoyama M, Hayashi H, Hashimoto N, Takahashi J.: Matrigel supports survival and neuronal differentiation of grafted embryonic stem cell-derived neural precursor cells. J Neurosci Res, published online (2009)

Takahashi J, Takagi Y, Saiki H. Transplantation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons in MPTP-treated monkeys. Methods Mol Biol **482**: 199-212 (2009)

Washida, K., Kato, Y., Kawamata, J., Takahashi, R.: Pathological gambling induced by dopamine agonist. Japanese Journal of Internal Medicine. **98**: 147-149 (2009)

2) 著 書

Asuka, M., Takahashi, J.: Embryonic stem cell transplantation for the treatment of Parkinson's disease. in Perspectives of Stem Cells. H. Ulrich (Ed.) Springer, in press.

3) 総 説

高橋 淳：幹細胞を用いた神経変性疾患治療法の開発 細胞工学 **28**(5): 473-477 (2009)

高橋 淳, 森実飛鳥：再生療法－ES 細胞, iPS 細胞 日本臨床 **67**(増刊 4): 440-443 (2009)

森実飛鳥, 高橋 淳：パーキンソン病の再生医療－ES 細胞, iPS 細胞を用いた細胞移植治療の展望. 総合臨床 **58**(1): 50-55 (2009)

森実飛鳥, 高橋 淳：ES 細胞, iPS 細胞を用いた細胞移植治療の臨床応用－Clinical Application of Cell Transplantation Using Pluripotent Stem Cell－. 月刊バイオインダストリー **26**(7): 34-39 (2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

森実飛鳥, 高橋 淳, Jia-Yi Li, Patrik Brundin：増殖可能なドーパミン神経前駆細胞のヒト ES 細胞からの誘導. 第 8 回日本再生医療学会総会 (2009.3.5-6. 東京)

森実飛鳥, 土井大輔, 菊地哲広, 宮本 享, 高橋 淳: ヒト多能性幹細胞からの神経誘導における Nodal/BMP 抑制の役割. 第 68 回日本脳神経外科学会学術総会(2009.10.14-17. 東京)

Morizane A., Doi D., Kikuchi T., Takahashi J.: Small molecules promote neural differentiation from human pluripotent stem cells in the stromal(PA6)cell co-culture condition(nanosymposium)「Neuroscience 2009(Society for neuroscience)」(2009.10.18. Chicago)

土井大輔, 菊地哲広, 林 英樹, 森実飛鳥, 宮本 享, 高橋 淳: ヒト ES 細胞由来の神経細胞移植における腫瘍形成とその回避. 日本脳神経外科学会(2009.10.14. 東京)

Doi, D., Kikuchi, T., Morizane, A., Saiki, H., Onoe, H., Hayashi, T., Hayashi, H., Sasai, Y., Takahashi, J.: Purification of human embryonic stem cell-derived neural progenitors prevents tumor formation in the monkey model of Parkinson's disease. Neuroscience 2009(Society for neuroscience) (2009.10.20. Chicago)

五味正憲, 高橋 淳, 丸茂 岳, 高木康志: マウス局所脳虚血モデルへの ES 細胞由来神経幹細胞移植における Anti-interleukin-6 receptor antibody の効果. 第 34 回日本脳卒中学会(2009.3.22. 松江)

Gomi, M., Fujimoto, M., Aoki, T., Hayase, M., Marumo, T., Nishimura, M., Takagi, Y.: The roles of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 during cerebral ischemia-reperfusion injury. Brain 2009(2009.7.3. Chicago)

五味正憲: ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞のマウス脳虚血モデルへの移植. 第 10 回日本分子脳神経外科学会(2009.9.20. 岡山)

鷺田和夫, 猪原匡史, 高橋 淳, 山下 潤, 伊東秀文, 富本秀和, 高橋良輔: マウス慢性脳低灌流モデルに対する血管前駆細胞移植の効果. 日本神経学会総会(2009.5.20. 仙台)

鷺田和夫, 猪原匡史, 西尾佳子, 藤田裕之, 高橋 淳, 呉 暁峰, 木原武士, 伊東秀文, 富本秀和, 高橋良輔. マウス慢性脳低灌流モデルに対するテルミサルタンの効果. 京都脳腎連関分子病態研究会(2009.9.10. 京都)

鷺田和夫, 猪原匡史, 高橋 淳, 山下 潤, 伊東秀文, 富本秀和, 高橋良輔: マウス慢性脳低灌流モデルに対する血管前駆細胞移植の効果. 日本神経科学大会(2009.9.16. 名古屋)

Washida K, Ihara M, Takahashi J, Yamashita J, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R. The effect of telmisartan on chronic cerebral hypoperfusion mouse model. Neuroscience 2009(2009.10.19. Chicago)

菊地哲広, 森実飛鳥, 土井大輔, 高橋 淳: 浮遊培養法による iPS 細胞からの神経分化誘導. 神経組織の成長・再生・移植研究会 第 24 回学術集会(2009.6.21. 浜川市)

菊地哲広, 森実飛鳥, 土井大輔, 宮本 享, 高橋 淳: 浮遊培養法によるヒト iPS 細胞からの神経分化誘導. 日本脳神経外科学会第 68 回学術総会(2009.10.14-16. 東京)

Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J.: Feeder-free and chemically-defined culture method to induce neural cells from human ES and iPS cells. Neuroscience 2009(2009.10.17-21. Chicago)

吉川達也, 滝 和郎, 宮本 享, 高橋 淳: バイオマトリックスを用いた神経細胞移植. 第 68 回日本脳神経外科学会学術総会(2009.10.14. 東京)

2) 講演・シンポジウム

高橋 淳: ES, iPS 細胞移植によるパーキンソン病治療へ向けての試み. 「第 6 回神奈川ニューロサイエンスセミナー」(2009.1.30. 横浜)

高橋 淳: ES 細胞移植によるパーキンソン病治療法の開発. 「京都大学ウイルス研究所シンポジウム」(2009.2.18. 京都)

- 高橋 淳：幹細胞脳内移植におけるバイオマトリクス. 「再生医科学研究所医工学フォーラム」(2009.2.25. 京都)
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する細胞移植治療の現状と展望. 「パーキンソン病 基礎と臨床の最前線シンポジウム」(2009.3.7. 京都)
- 高橋 淳：ES 細胞を用いたパーキンソン病治療の開発～再生医療の今と未来～. 「平成 20 年度奈良市医師会学術講演会」(2009.3.21. 奈良)
- 高橋 淳：ES 細胞移植によるパーキンソン病治療法の開発. 「第 6 回大阪ニューロサイエンスクラブ」(2009.3.27. 大阪)
- 高橋 淳：細胞移植による神経再生. 「日本医工学治療学会第 25 回学術大会」(2009.4.12. 大阪)
- Jun Takahashi: Application of ES and iPS cells for the treatment of Parkinson's disease. 「The 10th international cell transplant congress」(2009.4.20. Okayama)
- 高橋 淳：ES 細胞研究と臨床への期待. 「第 29 回日本脳神経外科コンgres総会」(2009.5.15. 大阪)
- 高橋 淳：細胞移植による神経再生の将来. 「第 50 回日本神経学会総会」(2009.5.21. 仙台)
- 高橋 淳：ES 細胞, iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療へ向けての現状と展望. 「第 5 回長崎ニューロサイエンス研究会」(2009.5.23. 長崎)
- 高橋 淳：ES, iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療開発研究の現状と展望「パーキンソン病医療講演会」(2009.6.27. 堺)
- 高橋 淳：ヒト ES 細胞移植における腫瘍形成能の検討「第 32 回日本神経科学大会 Neuroscience2009」(2009.9.16. 名古屋)
- 高橋 淳：ES, iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療の展望「第 14 回パーキンソン病フォーラム～基礎と臨床～」(2009.10.3. 京都)
- 高橋 淳：多能性幹細胞移植によるパーキンソン病治療の現状と展望「第 14 回東北パーキンソン病治療研究会」(2009.11.14. 仙台)
- 高橋 淳：ES, iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療の展望「第 38 回さいたま市神経カンファレンス学術講演会」(2009.11.17. 埼玉)
- Morizane A.: Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells and iPS cells 「AXREGEN NCoE and NeuroFortis Workshop」(招待講演) (2009.9.16-19. Lund, Sweden)
- 森実飛鳥：基礎研究から臨床応用へ：ES 細胞, iPS 細胞を用いたパーキンソン病に対する細胞移植治療の将来展望. 「第 14 回静岡健康・長寿学術フォーラム」(招待講演) (2009.10-2-5. 静岡)
- =====

組織再生応用分野 Department of Tissue Regeneration

分野主任 教授 戸口田 淳也

Prof. Junya Toguchida

【研究概要】

本研究分野の目標は間葉系組織の増殖分化機構を理解し、その成果にもとづいて、間葉系組織の臨床病態に対する新規治療法を開発することである。以下のテーマについて現在研究を遂行している。

1. 間葉系幹細胞の増殖及び分化制御機構の解明

骨髄間質細胞中には、間葉系組織の様々な細胞に分化可能な組織幹細胞である間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) が存在しているとされている。しかし MSC の本態に関しては未解明な点が多く、MSC を用いた間葉系組織の再生医療を科学的根拠に基づいた医療とするためには、その理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科学教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行ってきた。増殖制御機構に関しては、細胞周期制御因子である p16 遺伝子の発現亢進が細胞老化を誘導し、増殖停止をもたらす主因であることを報告した。続いて低酸素環境での培養により、p16 遺伝子の発現亢進が阻害でき、細胞老化に至ることなく、かつ分化能を維持したまま長期間増殖を継続できること、更に低酸素により ERK の活性が阻害され、それが p16 遺伝子の発現亢進阻害の一因であることを見出した。これらの結果は、MSC の分化能を規定する因子の解明に寄与し、MSC の本態解明への足がかりとなるものと考えている。

2. 間葉系幹細胞の癌化監視機構の開発

癌の起源細胞が各組織に存在する組織幹細胞であることを示す報告が相次いでおり、MSC の場合、間葉系組織由来の腫瘍、すわなり肉腫の起源細胞になりうる。実際マウスのみならずヒト MSC においても、標準的な培養操作のみで in vitro 形質転換が生じうることが示されており、MSC を用いた間葉系組織の再生医療の遂行に当たって無視できない状況になっている。我々は培養過程における癌化の初期変化としての p16 遺伝子のメチル化に注目し、実際に p16 遺伝子のメチル化が培養過程で発生し、それにより細胞の増殖能が亢進する場合があることを報告した。そこでこれらの結果に基づいて、バイサルファイト処理によるメチル化特異的 PCR 反応と遺伝子増幅定量法を組み合わせ、1 万個に 1 個のメチル化陽性細胞の混入を検定できる定量的メチル化測定法を開発した。MSC の標準的安全性評価法の一つとして、JIS 等を通じて公表していく予定である。

3. MSC 単離用デバイスの開発

MSC を用いた細胞治療が広く行われるためには、簡便かつ安全な単離法の開発も重要な課題の一つである。我々は企業との共同研究により、骨髄中の細胞より MSC を含む分画を効率よく単離できる不織布デバイスを開発した (図 1)。このデバイスを用いて単離した細胞は、従来の遠心分離法により単離された細胞と同様に、壊死骨モデルを用いた in vivo の実験において、骨組織を再生することが判明し、臨床応用の際の有用なツールとなると期待される。

4. MSC を用いた骨壊死病態に対する新規治療法の臨床応用

MSC を用いた再生医療の実践として、骨壊死病変に対する細胞移植治療法の開発に取り組んでいる。イヌを用いた基礎実験のデータに基づき、京都大学医学部附属病院内の分子細胞治療センターを使用する臨床治験を平成 18 年 9 月 1 日に施行された「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に基づいた臨床研究として京都大学医学部医の倫理委員会及び厚生労働大臣諮問委員会に申請し、平成 19 年 11 月 25 日国内初の承認を受けた。平成 20 年 2 月 5 日に第一例の治療を開始し、平成 21 年 12 月末までに 15 例の治療を施行した。最終的に 20 例に対し施行し、2 年間の経過観察後、治療成績を評価する予定である。

5. 骨軟骨再生に対するプロスタノイド受容体作動性物質の応用

細胞を用いた再生医療と同時に、薬剤等による *in situ* での組織再生の探求も重要な課題である。我々は生理活性物質であるプロスタノイドに注目し、その受容体特異的作動薬の応用を検討してきた。まずプロスタグランディン E2 受容体の中の EP2 受容体に特異的に作用するアゴニストにより、軟骨細胞の増殖が促進されることを報告し、この知見に基づき、家兎を用いた *in vivo* 治療実験を行った。その結果、EP2 アゴニストにより関節軟骨の修復が促進され、かつ正常な骨軟骨境界構造が構築され、長期に渡り関節構造が維持されることを見出した。続いてプロスタサイクリン受容体である IP 受容体作動薬が、骨粗鬆症モデルラットにおいて骨量を改善することを見出した。これらの生理活性物質受容体特異的作動薬は、臨床応用が期待できる薬物であると考えている。

6. iPS 細胞に関する研究

平成 19 年 11 月に山中伸弥教授らによって樹立されたヒト iPS 細胞は、自家多能性幹細胞を用いた再生医療を可

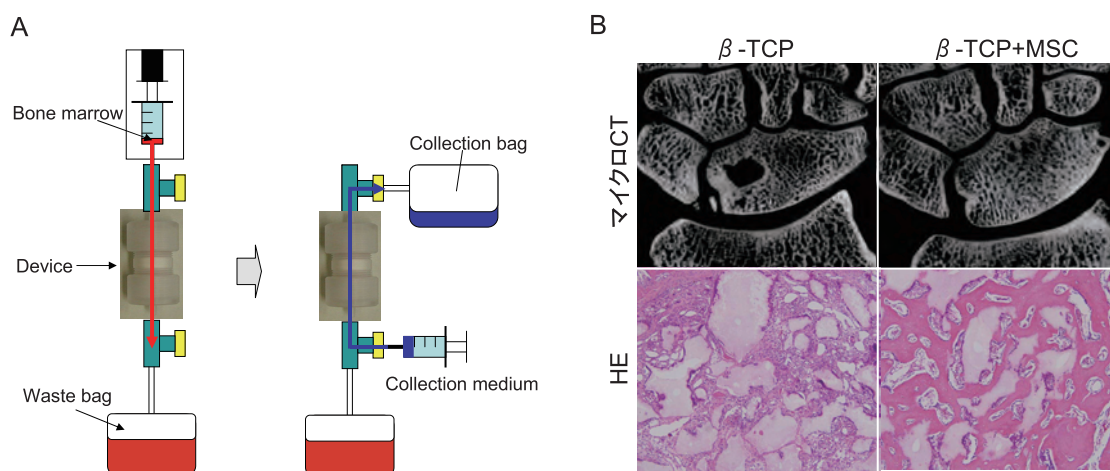


図 1. MSC 単離用デバイスを用いた骨再生

- A. デバイス及び単離システム。骨髓液をデバイスに充填し、MSC を不織布に付着させ(図左)、その後、単離用培養液を逆流させることで MSC を回収する(図右)。
- B. デバイスを用いて単離した MSC による骨再生。液体窒素処理により作成したイヌ月状舟状骨壊死モデルに人工骨(β-TCP)のみ、あるいは人工骨とデバイスにより単離した MSC を移植、4 週後に CT 撮影及び HE 染色により再生組織を評価した。MSC 併用群で良好な骨再生が認められている。

Figure 1. Bone regeneration using MSCs isolated by the device

- A, Device and isolating procedures. Apply bone marrow aspirates to the device to attach MSCs to non-woven fabrics(left panel), and then collect MSCs by retrograde flow of collecting medium.
- B, Bone regeneration using MSCs isolated by the device. Animal models of osteonecrosis model of were created in scapholunate of dogs by liquid nitrogen treatment, and β-TCP was transplanted with or without MSCs isolated by the device. Four weeks after transplantation, bone regeneration was evaluated by micro CT and histological specimens stained by HE. Good bone regeneration was observed in MSCs-transplanted cases.

能とする画期的な細胞である。我々は平成20年1月22日に設立された京都大学iPS細胞研究センターの一員として、iPS細胞に関する研究を行っている。現在のテーマは、iPS細胞からのMSCの誘導法の樹立、樹立細胞源として骨髄間質細胞と皮膚線維芽細胞の異同、及び骨軟骨関連難治性疾患患者からのiPS細胞の樹立である。

(文責 戸口田淳也)

The major objectives of our department are to understand the basic biology of growth and differentiation of mesenchymal cells and to develop new therapeutic modalities for pathological conditions in mesenchymal tissues. Following projects are currently undertaken.

1. Regulation of growth and differentiation potential of mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells (MSC), which exist in bone marrow stromal tissues, have a potential to differentiate to cells of various types in mesenchymal tissues. However, many fundamental features of MSC are still unknown, which are crucial for the development of regeneration therapy using MSC as the evidence based medicine. In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs. As for the growth regulation, we found that increased expression of the p16 gene, which is a key regulator of cell cycle, was the main cause inducing the senescence and growth arrest of MSC. We also found that the hypoxic culture condition inhibited the upregulation of the p16 gene, and retained MSCs in the senescence-free state with multidirectional differentiation properties. We also found that hypoxia down-regulated the activity of ERK, which, at least in part, involved in the down-regulation of the p16 gene. These findings will help to identify factors responsible for multidirectional differentiation properties of MSC and to understand the basic biology of MSC.

2. Establishment of surveillance system for transformation of MSC

Cancer cells are now considered to be derived from stem cells resided in each tissue, and therefore MSCs are potentially progenitors of malignant tumors developed in the mesenchymal tissues, sarcomas. There are a number of reports showing that not only murine but human MSCs could be transformed in vitro under standard culture condition. This issue should be seriously considered to promote the regenerative medicine in mesenchymal tissues using MSC. As one of important initial mutations, we have focused on the methylation of the p16 gene and found that the methylation of the p16 gene took place during the in vitro culture of MSC elongating the in vitro life. Based on these findings, we have established the methods to detect cells with methylated p16 gene by the combination bisulfite treatment and of methylation-specific quantitative PCR. Using this method we can detect one cell with methylated p16 gene among 10,000 normal cells, which will be proposed to JIS as one of standard method to evaluate the safety of MSCs.

3. Development of a new device for isolating MSCs.

To apply MSCs for the cell therapy in various fields, it is an important issue to develop efficient and safe method to isolate MSCs. In collaboration with an industrial company, we have developed a new device composed of non-woven fabrics (Figure 1). Cells isolated by this device regenerated bone tissues in animal model of osteonecro-

sis as well as cells isolated by conventional centrifuge method. This device will be a useful tool for clinical application of MSCs.

4. Clinical trial of the new treatment for osteonecrosis using MSC.

As the clinical application of MSC, we have engaged in the development of cell transplantation therapy for osteonecrosis. Based on the results obtained by the animal experiments using dogs, we established the protocol for the clinical trial in collaboration with Center for Cellular and Molecular Therapy in Kyoto University Hospital, which followed the guideline for the clinical trial using somatic stem cells issued by the the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) on September 1, 2006. After the review of ethical committee of Kyoto University and MHLW, our protocol was approved on November 25, 2007, and the first case was registered on November 31, 2007. Since then 15 cases have been treated until the end of December 2009. Twenty cases will be treated during two years, followed for two years, and evaluated by radiological and clinical examination.

5. Application of agonist for the PGE2 receptors for the articular cartilage repair

In addition to the development of cell therapy, it is also important to develop the in situ treatment using drugs or small molecular materials. We have focused on prostanoids, which belong to physiological active materials, and applied receptor agonists for the regeneration therapy. First we focused on EP2, which is one of four types of prostaglandin E2 receptor, and reported that the agonist specific to EP2 stimulated the growth of mouse and human chondrocytes extracted from articular cartilage. Based on these results, we have performed the in vivo experiments using rabbits, and found that in combination with appropriate drug carriers, EP2 agonist enhanced the cartilage regeneration in vivo, and also contributed to reconstruct the osteo-chondral boundary, which is important factor to maintain normal structure of articular cartilage. As for second issue, we analyzed the prostacyclin signals, and found that the agonist for IP, which is a receptor for prostacyclin, increased bone mass of rat model for osteoporosis. These receptor-specific agonists are promising molecules for clinical application.

6. Research related to iPS cells

iPS cells are autologous pluripotent cells, which were established by Prof. Shinya Yamanaka on November 2007. We have been engaging the research related to iPS cells as the faculty member in the Center for iPS Research and Application, Kyoto University, which was established on January 22, 2008. Current themes are ; the induction of MSC from iPS cells, the difference between bone marrow stromal cells and skin fibroblasts as the cell source for iPS cells, and the establishment of iPS cells from patients suffering bone and cartilage diseases with no effective treatments.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Fukukawa C, Nagayama S, Tsunoda T, Toguchida J, Nakamura Y, Katagiri T. Activation of the non-canonical Dvl-

- Rac1-JNK pathway by Frizzled homologue 10 in human synovial sarcoma. *Oncogene* **28**: 1110-20 (2009)
- Matsubara H, Watanabe M, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Kamitsuji Y, Watanabe KI, Nishijo K, Toguchida J, Nakahata T, Adachi S. Involvement of ERK activation in human osteosarcoma cell resistance to the HDAC inhibitor FK228. *J Pharmacol Exp Ther*. **328**: 839-48 (2009)
- Nagayama S, Yamada E, Kohno Y, Aoyama T, Fukukawa C, Kubo H, Watanabe G, Katagiri T, Nakamura Y, Sakai Y, Toguchida J. Inverse correlation of the up-regulation of FZD10 expression and the activation of beta-catenin in synchronous colorectal tumors. *Cancer Sci* **100**: 405-12 (2009)
- Otsuka S, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Fukiage K, Kohno Y, Maruyama T, Kanaji T, Nishiura A, Sugihara H, Fujimura S, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. PGE2 signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **17**: 529-38 (2009)
- Katakura H, Fukuse T, Shiraishi I, Hayatsu E, Nishijo K, Toguchida J, Nakashima Y, Wada H. Mediastinal synovial sarcoma. *Thorac Cardiovasc Surg* **57**: 183-5 (2009)
- Toguchida J, Nakayama T. Molecular genetics of sarcomas: Applications to diagnoses and therapy. *Cancer Sci* **100**: 1573-80 (2009)
- Okoshi K, Nagayama S, Furu M, Mori Y, Yoshizawa A, Toguchida J, Sakai Y. A case report of pathologically complete response of a huge rectal cancer after systemic chemotherapy with mFOLFOX6. *Jpn J Clin Oncol* **39**: 528-33 (2009)
- Morikawa H, Tanaka T, Hamaji M, Ueno Y, Yasuda S, Kato T, Kohno Y, Toguchida J. A case of primary synovial sarcoma of the thorax with a variant SYT-SSX1 fusion transcript. *Ann Thorac Surg* **88**: 297-300 (2009)
- Chen F, Miyahara R, Bando T, Okubo K, Watanabe K, Nakayama T, Toguchida J, Date H. Repeat resection of pulmonary metastasis is beneficial for patients with osteosarcoma of the extremities. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **9**: 649-53 (2009)
- Ito K, Aoyama T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Jin Y, Nasu A, Ueda M, Kasai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Kobayashi A, Yoshida S, Niwa H, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Apr 13. [Epub ahead of print]
- 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた再生医療の現状と課題. *血液フロンティア* **19**: 25-30 (2009)
- 戸口田淳也. 肉腫幹細胞と組織幹細胞. *実験医学* **27**: 193-199 (2009)

2) 著 書

1. 戸口田淳也, 加藤友久. 京都大学 iPS 細胞研究統合推進拠点. 144-151 iPS 細胞の産業的応用技術 山中伸弥監修 シーエムシー出版 東京 (2009).

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Ryosuke Ikeguchi, Ryosuke Kakinoki, Tomoki Aoyama, Koji Goto, Taira Maekawa, Takashi Nakamura, Junya Toguchida. Clinical application of bone marrow stromal cells to avascular necrosis of the femoral head com-

- bined with vascularized iliac bone graft. Annual Scientific Meeting of American Society for Reconstructive Microsurgery (2009.1.10. Maui)
- 中畑龍俊, 平家俊男, 戸口田淳也, 山中伸弥. 疾患特異的 iPS 細胞研究の現状と将来. 第 8 回再生医療学会 (2009.3.5. 東京)
- 青山朋樹, 大塚聖視, 布留守敏, 伊藤錦哉, 金 永輝, 那須 輝, 三井裕人, 丸山隆幸, 金治敏也, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也. プロスタグランディン E2 は EP2 受容体を介して in vivo においても軟骨修復を促す. 第 22 回日本軟骨代謝学会 (2009.3.6. 名古屋)
- 中畑龍俊, 戸口田淳也, 山中伸弥. 京都大学拠点について. 第 8 回再生医療学会 (2009.3.6. 東京)
- 戸口田淳也. 標準的評価法を目指した間葉系幹細胞のエピゲノム変異解析. 第 8 回再生医療学会 (2009.3.6. 東京)
- 伊藤錦哉, 青山朋樹, 吹上謙一, 大塚聖視, 金 永輝, 那須 輝, 上田路子, 笠井泰成, 芦原英司, 木村晋也, 前川 平, 小林 明, 吉田進也, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也. 骨髄間葉系幹細胞分離法デバイスの開発. 第 8 回再生医療学会 (2009.3.6. 東京)
- 梶田洋一郎, 布留守敏, 長山 聡, 西山博之, 中村英二郎, 賀本敏行, 小川 修, 戸口田淳也. 新規軟部肉腫転移関連遺伝子 C7059 の前立腺癌における機能解析第 97 回日本泌尿器科学会総会 (2009.4.16. 岡山)
- 仲俣岳晴, 中山富貴, 坪山直生, 戸口田淳也, 中村孝志. 小児下肢悪性骨腫瘍に対する伸長型人工関節の治療成績. 第 18 回小児固形腫瘍研究会 (2009.5.22. 京都)
- 河田紗耶架, 才田 聡, 田中篤志, 北 誠, 藤野寿典, 松原 央, 渡邊健一郎, 足立壮一, 仲俣岳晴, 中山富貴, 戸口田淳也, 溝脇尚志. 多発骨転移を伴った右腸骨原発 Ewing 肉腫の 1 女児例. 第 18 回小児固形腫瘍研究会 (2009.5.22. 京都)
- 梶田洋一郎, 布留守敏, 長山 聡, Elalaf Hassan, 小林恭介, 佐藤信吾, 早川和男, 玉置さくら, 笠原 崇, 末吉達也, 三井裕人, 那須 輝, 金 永輝, 加藤友久, 青山朋樹, 仲俣岳晴, 中山富貴, 戸口田淳也. 新規軟部肉腫転移関連遺伝子 C7059 の前立腺癌における機能解析第. 第 25 回近畿肉腫研究会 (2009.5.27. 守山)
- 戸口田淳也. 幹細胞を用いた再生医療の実践と課題. 第 19 回日本サイトメトリー学会学術集会 (2009.6.21. 松江)
- Akira Nasu, Tomohisa Kato, Sakura Tamaki, Kazuo Hayakawa, Hiroto Mitsui, Tomoki Aoyama, Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka, Junya Toguchida. Revere differentiation and re-differentiation of bone marrow stromal cells containing mesenchymal stem cells. 7th ISSCR (2009.7.10. Barcelona)
- Yonghui Jin, Tomohisa Kato, Sakura Moritoshi Furu, Akira Nasu, Yoichiro Kajita, Hiroto Mitsui, Mitcho Ueda, Tomoki Aoyama, Junya Toguchida. The effect of hypoxia on proliferation and differentiation properties of human bone marrow stromal cells. 7th ISSCR (2009.7.10. Barcelona)
- 戸口田淳也, 中山富貴, 仲俣岳晴, 中村孝志. 骨肉腫研究: 興奮, 消沈, 諦観, そして再び未来への夢. 第 42 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2009.7.16. 横浜)
- Yoichiro Kajita, Moritoshi Furu, Satoshi Nagayama, Hiroyuki Nishiyama, Eijiro Nakamura, Osamu Ogawa, Junya Toguchida. Functional analysis of a novel soft tissue sarcoma metastasis-associated molecule in prostate cancer 第 30 回 Congress of Societe Internationale d'Urologie 国際泌尿器科学会 (2009.11.4. Shanghai)
- 梶田洋一郎, 布留守敏, 長山 聡, 加藤友久, 青山朋樹, 西山博之, 中村英二郎, 賀本敏行, 小川 修, 戸口田淳也. Sp3 は新規肉腫転移関連遺伝子 C7059 の発現を制御する. 第 68 回日本癌学会総会 (2009.10.1. 横浜)
- 長山 聡, 布留守敏, 井元清哉, 高橋 亮, 久保 肇, 片桐豊雅, 中村祐輔, 戸口田淳也, 坂井義治. 大腸癌で高発現している新規の再発予測因子. 第 68 回日本癌学会総会 (2009.10.2. 横浜)

布留守敏, 梶田洋一郎, 長山 聡, 高橋 亮, 笠原 崇, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也. 肉腫において C7059 はボドゾームの形成を介して細胞浸潤に関与する. 第 68 回日本癌学会総会(2009.10.3. 横浜)

柿木良介, 池口良輔, 中山 憲, 山川知之, 青山朋樹, 戸口田淳也, 中村孝志. 骨髓幹細胞移植した血管茎含有チューブでのイヌ尺骨神経 30mm の架橋実験-自家神経移植との比較-第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会(2009.11.5. 横浜)

金永 輝, 加藤友久, 布留守敏, 伊藤錦哉, 那須 輝, 上田路子, 青山朋樹, 中村孝志, 戸口田淳也. 骨髓間質細胞の増殖, 分化に対する低酸素培養の効果. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会(2009.11.5. 横浜)

那須 輝, 加藤友久, 玉置さくら, 早川和男, 青山朋樹, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也. 間葉系幹細胞と人工多能性幹細胞由来間葉細胞の比較検討による間葉系分化機構の解析. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会(2009.11.5. 横浜)

伊藤錦哉, 青山朋樹, 加藤友久, 布留守敏, 三井裕人, 早川和男, 酒井芳紀, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也. OVX ラットモデルにおいて, プロスタサイクリン受容体作動薬は骨芽細胞に直接作用し骨形成を促す. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会(2009.11.5. 横浜)

Yonghui Jin, Kato T, Aoyama T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Nakamura T, Toguchida J., The effect of hypoxia on proliferation and differentiation properties of human bone marrow stromal cells. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium/Retreat 2009(2009.11.7. 淡路島)

Nasu A, Kato T, Tamaki S, Hayakawa K, Mitsui H, Aoyama T, Takahashi K, Yamanaka S, Toguchida J, Reverse differentiation and re-differentiation of bone marrow stromal cells containing mesenchymal stem cells. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium/Retreat 2009 (2009.11.7. 淡路島)

大部 聡, 杉野啓憲, 松原 央, 田中篤志, 藤野寿典, 渡邊研一郎, 足立壮一, 中山富貴, 仲俣岳晴, 坪山直生, 戸口田淳也. 頸椎原発脊索腫の 1 例. 第 19 回小児固形腫瘍研究会(2009.11.19. 京都)

中山富貴, 仲俣岳晴, 中村孝志, 坪山直生, 戸口田淳也. 重粒子線治療を行った体幹部骨肉腫の治療成績. 第 19 回小児固形腫瘍研究会(2009.11.19. 京都)

戸口田淳也, 青山朋樹, 中村孝志. 間葉系幹細胞を用いた骨壊死に対する新規治療法の開発. 第 31 回本バイオマテリアル学会大会(2009.11.17. 京都)

青山朋樹, 岡本 健, 吹上謙一, 大塚聖視, 布留守敏, 伊藤錦哉, 金 永輝, 上田路子, 長山 聡, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也. Reversible down-regulation of cartilage-specific gene, chondromodulin-I, in mesenchymal cells and tissues by intrinsic histone modifiers, YY1 and p300. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.10. 横浜)

玉置さくら, 加藤友久, 梶田洋一郎, 戸口田淳也. Oncogenic regulation of FZD10 in synovial sarcoma. 第 32 回日本分子生物学会年会(2009.12.9. 横浜)

玉置さくら, 加藤友久, 長山 聡, 梶田洋一郎, 戸口田淳也. Oncogenic regulation of the synovial sarcoma associated gene, FZD10. 第 33 回近畿肉腫研究会(2009.12.19. 大阪)

2) 講演・シンポジウム

戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた臨床試験について. 医工学フォーラム(2009.2.25. 京都)

戸口田 淳也. 骨軟部腫瘍の分子生物学：診断治療への応用の現状と期待. 日本ユウイング肉腫研究グループ総会 (2009.1.17. 東京)

戸口田 淳也. 骨軟部腫瘍の分子生物学. カン研究所講演会 (2009.1.20. 神戸)

戸口田 淳也. 細胞を用いた再生医療の実践と課題. 第 222 回甲賀臨床懇談会 (2009.3.26. 水口)

戸口田 淳也. 幹細胞を用いた再生医療の現状と展望. 第 1 回神戸京整会症例検討会・特別講演会 (2009.8.8. 神戸)

戸口田 淳也. 幹細胞を用いた再生医療の現状と展望. 分析展 JAIMA コンファレンス (2009.9.2. 千葉)

戸口田 淳也. 細胞を使って病気を治す. 平成 21 年度京都大学再生医科学研究所公開講演会 (2009.9.26. 京都)

戸口田 淳也. 「iPS 細胞医療応用加速化プロジェクト」について. 第 16 回組織工学・再生医学ワークショップ (2009.9.26. 京都)

戸口田 淳也. 細胞を用いた再生医療の概要と展望－間葉系幹細胞と iPS 細胞. iPS 時代におけるキリスト教の生命倫理 (2009.10.10. 京都)

戸口田 淳也. 臨床と研究の狭間で思うこと. 米子東高等学校 110 周年記念講演会 (2009.10.11. 米子)

戸口田 淳也. 再生医療の今－失われた骨を再生する. iPS 細胞研究のいま その可能性と研究活動 CiRA 市民公開講座 (2009.10.17. 京都)

器官形成応用分野 Department of Organ Reconstruction

准教授 角 昭一郎

Assoc. Prof. Shoichiro Sumi

【研究概要】

本分野では、糖尿病の再生医療を中心的な研究テーマとしており、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。重症の糖尿病で、インスリン補充療法による血糖コントロールが困難な場合、膵臓や膵島の移植が適応となる。しかし、ドナー不足と永続的な免疫抑制という移植医療に共通の問題は避けられず、いつでも受けられる安全な治療法という理想からは大きな隔たりがある。また、低侵襲の移植医療として大きな期待を担ってきた膵島移植は、長期的な有効性に疑問が持たれるなどなお解決されるべき問題が多い。このような現状で、糖尿病の再生医療に大きな期待がもたれている。

膵島再生医療を実現するための道筋としては、最も直接的に自己の膵島再生を促進する方法、自己または他者に由来する組織幹細胞あるいは ES(胚性幹)細胞や iPS(人工多能生幹)細胞から膵島様細胞を分化誘導する方法、さらに、ヒト以外の異種動物の膵島を分離して利用する方法などが研究されている。しかし、患者自身に由来する細胞ではなく、他者や異種の細胞を移植する場合には拒絶反応の対象となり、また、治療対象となる重症糖尿病の多くが自己免疫の関与する 1 型(インスリン依存性)糖尿病であることを考慮すると、免疫拒絶を防ぐには膵島や膵島様細胞を患者の免疫機構から保護する対策が必要である。本分野では、免疫隔離能を有する各種の半透膜で膵島や膵島様細胞を患者の免疫機構から保護する対策が必要である。本分野では、免疫隔離能を有する各種の半透膜で膵島や膵島様細胞を包んで拒絶反応を抑制することで、免疫抑制を行うことなく膵島移植と同等の治療効果が期待され

るバイオ人工膵の研究を行っている。実際に、異種膵島移植国外ではマイクロカプセル化ブタ膵島の腹腔内移植による糖尿病治療の臨床研究がすでに行われており、一定の成果をあげている。

本分野では、ラットやブタの膵島分離法を確立し、これらを用いてマイクロカプセル化膵島の研究を行って来た。マイクロカプセル化膵島は、前述のマイクロカプセル化膵島が一度移植すると回収困難であるのに比べて、回収や交換が可能であり、臨床応用にはより有利と考えられる。過去には、メッシュ補強ポリビニルアルコール(PVA)バッグやポリスチレンスルホン酸混合アガロースゲルによるカプセル化など、各種のマクロデバイスの研究開発を行うとともに、あらかじめ血管誘導処置を施した皮下組織にこのようなデバイスを移植することで異種膵島による長期の血糖正常化が達成されることをマウス糖尿病モデルの治療実験で明らかにしてきた。さらに近年では、イヌなど大型動物や最終的な目標であるヒトに応用可能な大型のバイオ人工膵を作製することをめざした新しい独自のバイオ人工膵作成技術として、膵島の凍結保存法と凍結によるPVAのゲル化を組み合わせた作製法を開発して、その有用性をマウスおよびラットの糖尿病モデルへの移植実験で確認している。即ち、膵島凍結保存液にPVAを溶解した粘性の高い溶液に膵島を浮遊させ、この液体をメッシュで補強してシート状に成形した後、凍結・溶解してゲル状のバイオ人工膵シートを作成する。この方法によれば、デバイスの面積や厚さを自由にコントロールすることが可能で、将来の大型化に大きく道を拓くものと考えている。

本年は、このPVAマイクロカプセル化膵島を用いてラットから重症糖尿病ラットへの同種同系および同種異系膵島移植実験を行って、デバイスの効果と問題点を明らかにした。その結果、単純な膵島移植では拒絶されるウィスター系からルイス系への移植であっても、次第に減弱はするものの最長24週間の高血糖は正効果が得られることを確認している。一方、ルイス系からルイス系への膵島移植は拒絶されることなく長期にわたり機能するが、この系で膵島をマイクロカプセル化した場合は、異系の場合と類似した経過で機能が減弱することが示唆された。これを受けて、カプセル化膵島の機能維持等を目指したカプセル化法の基礎的検討を行い、PVA濃度や添加タンパク質の最適化に一定の成果を得た。また、PVAゲルの物質放出能を検討し、ブドウ糖・インスリンは10分程度で放出が完了するが、IgGはほとんど放出しない(透過しない)ことを確認した。

また、*in vitro*では増殖せず長期培養が困難な膵島細胞と、高い増殖能を有する間葉系幹細胞とを細胞融合させることで、より糖尿病治療に適した細胞を作製する研究に取り組み、電気的に細胞融合した細胞が*in vitro*で長期にインスリン分泌能を維持するとともに移植効果も良好であることを示唆する結果を得ている。さらに、膵臓のマスターゾーンであるPDX1陽性の未分化細胞が膵島分離後の膵外分泌組織から培養できることを見だし、鳥取大学・押村教授のグループと共同でこのような細胞に各種遺伝子を搭載したヒト人工染色体を導入して糖尿病治療応用への可能性を検討している。

Our final goal is to establish regenerative medicine for diabetes mellitus, which should be a safe and effective therapy available whenever and wherever required for a growing number of diabetes patients world-wide. In severely diabetic patients, pancreas or islet transplantation is indicated, if good control of blood glucose levels is not available. However, donor shortage and complications due to immunosuppressive therapy are inevitable problems of allo-transplantation. In addition, islet transplantation that drew attention as a promising curable treatment has become less attractive because of rather a short duration of insulin-free period after transplantation. Therefore, current transplantation therapies are still far from our dream. In such circumstances, regenerative medicine for diabetes is looked forward to, with great expectations.

In order to develop regenerative medicine for diabetes mellitus, there are several different approaches such as

enhancement of patient's own islet regeneration, auto- or allo-geneic islet-like cells differentiated from somatic, embryonic or induced pluripotent stem cells *in vitro* and xeno-geneic islets isolated from the pancreas of animals e.g. pigs. However, as long as non-self cells are used and even autologous cells are used to type-1 diabetes that has autoimmune background, efficient immunosuppression should be required. In order to avoid it, we are diligently studying bio-artificial pancreas, in which islet cells are encapsulated by several kinds of semi-permeable membrane and thereby protected from host immune responses. In fact, clinical trial of micro-encapsulated porcine islets are ongoing in a few foreign countries, showing certain beneficial effects.

We have established isolation method of porcine pancreatic endocrine cells as well as rat islets. Using these islets, we have successfully shown the efficacy of several macro-devices of bioartificial pancreas. In contrast to micro-encapsulation that does not allow complete retrieval, macro-devices are retrievable and exchangeable, which is important advantage toward clinical application. In our past studies, mesh-reinforced polyvinyl alcohol (PVA) tube and bag, rod-shaped device of agarose containing polystyrene sulfonate, anti-complement substance, and so on were investigated in allo- and xeno-geneic situations. We have also shown that the subcutaneous site pretreated for angiogenesis can be successfully used for transplantation site of these devices, leading to long-term normalization of blood glucose levels in diabetic mice. Recently we developed a novel method to make a sheet-shaped PVA-macroencapsulated islets by a combination of the freezing technique of islets and the phenomenon that PVA solution becomes gel by freezing and thawing. Briefly, islets are suspended in islet freezing solution containing PVA and this viscous solution is molded into a mesh-reinforced sheet and then frozen. This method enables us to make a device of any size with any shape that may be applicable to bigger animals and humans.

Using this macro-device, we recently examined this device in iso- and allogeneic situations in rats and found that hyperglycemia can be improved as long as 24 weeks, although the effect gradually weakened, in the allogeneic situation in that transplanted free islets are promptly rejected (Wistar to Lewis). On the other hand, in isogeneic situation (Lewis to Lewis) in which free islets shows life-time engraftment, the effect of the device attenuates in a similar manner as in the allo-geneic situation. Therefore, we have made some basic improvement for long-lasting function and also demonstrated that the PVA gel is permeable for glucose and insulin but hardly so for IgG.

Other related researches are as follows. We have established a method of cell fusion between islet cells and mesenchymal stem cells and obtained results suggesting that such cells show persistent insulin-release *in vitro* and more efficient after transplantation. In addition, we found that PDX1 (the master gene of the pancreas)-positive undifferentiated cells can be cultured from exocrine tissue residual after islet isolation. And, in collaboration with Professor Oshimura and his colleagues of Tottori University, We are studying the possibility of the induction of human artificial chromosome carrying several genes to such cells toward diabetes therapy.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Zhi Qi, Chizuru Yamamoto, Naomi Imori, Ayano Kinukawa, Kai-chiang Yang, Goichi Yanai, Etsuko Ikenoue, Yanna Shen, Yasumasa Shirouzu, Akihito Hiura, Kazutomo Inoue, and Shoichiro Sumi. Immunoisolation effect of

- polyvinyl alcohol(PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. Cell Transplant. (In press)
- Yang KC, Wu CC, Sumi S, Kuo TF, SC Lin, Lin FH. Intramedullary Cavity as an Implant Site for Bioartificial Pancreas: An *In Vivo* Study on Diabetic Canine. Transplantation (in press)
- Yang KC, Wu CC, SC Lin, Sumi S, Lin FH. The *In Vivo* Performance of Bioartificial Pancreas in Bone Marrow Cavity: A Case Report of a Spontaneous Diabetic Feline. Biochemical and Biophysical Research Communications (in press)
- Yang KC, Wu CC, Sumi S, Theng CL, Wu YH, Kuo TF, Lin FH. Calcium Phosphate Cement Chamber as an Immunisolative Device for Bioartificial Pancreas: *In Vitro* and Preliminary *In Vivo* Study. Pancreas (in press)

2) 著書・総説

- 角 昭一郎. 生体臓移植. 特集「生体移植医療の実際」. 医学と薬学. **61**(3): 314-320, 2009.
- 角 昭一郎. 日本の再生医学研究の現状と展望. 独立行政法人科学技術振興機構(JST)中国総合研究センター編. 中国・日本科学最前線－研究の現場から－ 2009年版(分担). p187-p191, 2009.
- 角 昭一郎. 再生医療の現在とこれからの可能性. カワニシホールディングス社長室編. 正々の旗堂々の陣(分担). P213-p268, 2009.

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 漆 智, 山本ちづる, 柳井伍一, 池之上悦子, 呉 倩, 日裏彰人, 角昭一郎. ラット同種臓移植における PVA マクロカプセル化臓の作用. 第 8 回日本再生医療学会総会, 2009 年 3 月. 東京
- 角昭一郎. 移植医療に代わる次世代糖尿病治療の展望. 第 109 回日本外科学会定期学術集会 シンポジウム 7.I 型糖尿病臓移植治療の現状と展望－臓移植 vs. 臓移植. 4 月 2 日. 福岡
- Qi Z, Ikenoue E, Yanai G, Wu Q, Hiura A, Sumi S. Immun isolation effect of polyvinyl alcohol(PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. Cell Transplant Society & Organ Preservation and Medical Biology. April 2009, Okayama
- Qi Z, Qi M, Sakata N, Yamamoto C, Yanai G, Ikenoue E, Wu Q, Hiura A, Sumi S. Application of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in islet transplantation. The 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. June, 2009, Beijing, China
- 漆 智, 柳井伍一, 白水泰昌, 日裏彰人, 角昭一郎. ラット臓の同種移植における PVA マクロカプセル化臓の応用. 第 40 回日本臓学会. 2009 年 7 月 東京
- Qi Z, Yanai G, Ikenoue E, Wu Q, Hiura A, Sumi S. Long term cryopreservation of rat islets using PVA hydrogel. The 40th Anniversary Meeting for American Pancreas Society and Japanese Pancreas Society. November, 2009, Hawaii, USA,
- Yang KC, Qi Z, Lin FH, Sumi S. Chitosan Hydrogel as Immunisolative Matrix for Xenogeneic Islet Transplantation. 8th Japan Regenerative Medicine Society Annual Meeting. March, 2009, Tokyo
- Yang KC, Qi Z, Sumi S, Kuo TF, Lin FH. Chitosan/Gelatin Hydrogel as Immunisolative Matrix for Xenogeneic Islet Transplantation. 2009 Annual Meeting of the Polymer Society. P100, (Best oral presentation award) Janu-

ary, 2009, Taipei, Taiwan

Yang KC, Qi Z, Lin FH, Sumi S. Chitosan Hydrogel as an Immunoisolative Matrix for Xenogeneic Islet Transplantation. 15th Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2009). August, 2009, Northern Cyprus

Sumi S, Qi Z, Ikenoue E, Yanai G, Qi M, Gu YJ, Sakata N, Yamamoto C, Hiura A, Inoue K. Studies on poly vinyl alcohol (PVA) – macroencapsulated islets. Rachmiel-Levine Symposium March 2009, Anaheim, USA

Yanai G, Hayashi T, Shimabukuro T, Zhi Q, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Studies on electro-fusion of mesenchymal stem cells (MSCs) and pancreatic islet-cells. Global COE International Symposium/Retreat 2009. November, 2009, Awajishima

2) 講演・シンポジウム

角 昭一郎. 糖尿病の再生医療など. 第 78 回医用器材研究者サロン. 2009 年 2 月 京都

角 昭一郎. 糖尿病における再生医療. 大津医学生会サマーセミナー 2009 第 13 回市民健康講座. 2009 年 8 月 大津

臓器再建応用分野 Department of Bioartificial Organs

准教授 中村 達雄

Assoc. Prof. Tatsuo Nakamura

【研究概要】

臓器再建応用分野では、“*in situ* Tissue Engineering” の概念に基づいて再生医学を推進し、人類の幸福に貢献することを研究の第一目標にしています。これによって、未だ治療法がない症例や、或いは移植ドナー不足のため治療が受けられない患者さんが救われることを目指しています。さらに、再生医療が普及すると高騰を続けている医療費が抑制されることが期待されと考えています。

人間の体には、本来、再生能が備わっており、我々はそれらを引き出す新しい手法を開発しています。それが生体内再生 *in situ* Tissue Engineering です。すなわち、自己の細胞が増殖、分化できる適切な足場を体内に与えることによって、損傷を受けた自己の臓器が本来の構造と機能を再生出来るようにしています。研究の方法としては、再生医学の 3 つの柱である (1) 足場、(2) 細胞、(3) 増殖・成長因子 を生体内で働かせる “*in situ* Tissue Engineering” という手法を独自に開発し、それを進めています。具体的には、同種・異種の臓器や組織から酵素処理で免疫原性を完全に無くしたコラーゲンを抽出し、それを用いて作製した細胞外マトリックスや、或いは組織から細胞を完全に除去することにより作製した細胞外基質、さらには生体内で分解吸収される合成高分子を用い、それらに増殖因子などを除放させる DDS (薬物送達システム) を組み合わせることによって、欠落した組織や臓器が再生する枠組みを生体内に作ります。この枠組みを『足場』とし、生体内の幹細胞が増殖、分化することにより、自己の組織や臓器が再生復元されます。また、これらと平行して、iPS 細胞や脂肪由来幹細胞を樹立・増殖させて組織再生に

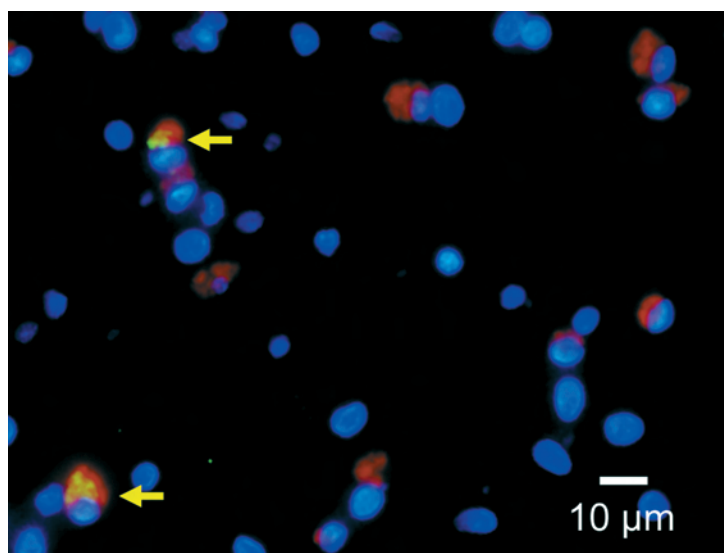
用いる研究や、瘢痕状になった細胞外マトリックスを融かして再び本来の性状に戻す研究も進めています。

現在行っている研究対象は下記のように分類されます。

- ①角膜，心膜，胸膜，腹膜，脳硬膜などの膜系
- ②血管，気管，喉頭，消化管などの管状臓器
- ③外力の加わる組織（骨，永久歯，歯根膜）
- ④末梢神経
- ⑤脊髄・大脳などの中枢神経系
- ⑥泌尿器系組織
- ⑦肺，腎臓，肝臓，甲状腺，上皮小体，脾臓などの実質性代謝臓器
- ⑧脂肪組織や筋肉組織，皮膚，その他軟組織
- ⑨人工臓器の開発や造影剤の研究
- ⑩手術器具・手術術式の研究
- ⑪バイオマテリアルの研究

当分野の研究の根幹概念は，細胞が増殖，再分化して，元の臓器を復元させる“場”（環境）を人工的に体の中に作れば，哺乳動物の臓器や組織も両生類のイモリのように再生復元させることが出来るというメカニズムを医学に応用するものです。このような“*in situ* Tissue Engineering”は世界に先駆けて我々が提唱してきた方法であり，人工気管や人工神経などはすでに臨床応用され，これによって救われる患者さんの数も着々と増えてきています。この新しい技術は21世紀の医療の中心的柱になるものと考えています。

In situ Tissue Engineering: We have devised a completely new approach to the development of artificial organs. The main procedure using tissue engineering for tissues and internal organs involves the removal of the



Adipose-derived stromal cells (ASCs) include stem cells, which have the potential to differentiate into a variety of cell lineages. These stem cells can differentiate into like neurons when they are implanted in the cerebral cortex (arrows). This technology belongs to *in site* tissue engineering and it is promising for regeneration of a variety of tissues.

脂肪由来間質細胞の中には，様々な細胞に分化する能力を持った幹細胞が含まれている。これら脂肪組織由来の幹細胞(ASCs)を大脳皮質に移植したところ，神経様に分化することが判明した(矢印)。この技術は，*in situ* tissue engineering と呼ばれており，様々な組織の再生に利用できるものと考えられている。

cell component from auto- or allo-organs to obtain only the extracellular matrix, so-called refined extracellular matrix (ECM) and reconstitutes the solid structure from the extracted collagen. This ECM or reconstituted structure is then employed as scaffolding, which after implantation into the patients is used for the regeneration or re-differentiation of tissue. Organs made of self-cells thus regenerate. Organs that regenerate in this manner not only possess highly differentiated tissue structures, but also show functional recovery, because all the cells are derived from the patients themselves. Whether or not our new method is practicable will depend mainly on the intrinsic regeneration capacity of each tissue. Up to now, in higher mammals including man, it has been believed that highly differentiated organs lose their ability to regenerate. We consider that mammals do not, in fact, lose this potential, and that the potential is hidden by excessively rapid wound healing around the failing tissues. In this sense, if we can provide good conditions using refined ECM, we can induce this hidden potential even in higher mammals. We have already carried out successful trials at regenerating peripheral nerves, the esophagus, the trachea, and blood vessels with this method. A similar method is also applicable to other soft tissue organs such as the liver, heart, and lung, as well as the spinal cord. These results will be welcomed by patients who are dependent on palliative life-support systems, or transplantation candidates who are waiting for suitable donors. An additional benefit is that patients will be freed from the side effects of immunosuppressive drugs. The judgment of the brain death can then be discussed separately from the issue of transplantation, and will become a personal problem. Furthermore, this new approach helps to reduce ever-expanding medical costs, which are in danger of destroying our health insurance system in the near future.

No study based on these concepts has ever been done either in Japan or abroad. In this sense, our pioneering work is expected to be a major area of medical science for the coming generation.

Strategy and targets of our study

The target organs currently being considered for this development project are the heart, heart valves, esophagus, stomach, intestine, gallbladder, trachea, lung, liver, kidney, peripheral nerves, spinal cord, cornea, tendons, ligaments, cartilage, bone, fatty tissue, periodontal tissue, and permanent teeth. We plan to employ the two major methods as described below.

ECM Method

To obtain the purified extracellular matrix, cell components are completely removed from homo or allo-organs. The solid structure is reconstituted from the ECM and extracted collagen. Growth factors are then applied to facilitate cell proliferation. Then this ECM-collagen-growth factor composite is implanted into the living body as a temporary scaffolding for new organ regeneration. Besides this, bioabsorbable materials will also be applied instead of purified ECM as a bulk structure for organ regeneration. Both extracted collagen and growth factors should facilitate cell proliferation and cell redifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

Cell+ECM Method

Cells (or living tissues) of patients are complexed (mixed) with purified ECM or bioabsorbable material. Using

this complex, reconstruction of the failing tissues or organs will be attempted. Mesenchymal stem cell (MSC) obtained from the bone marrow is now applied to this method.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Nakamura, T., Sato, T., Araki, M., Ichihara, S., Nakada, A., Yoshitani, M., Itoi, S., Yamashita, M., Kanemaru, S., Omori, K., Hori, Y., Endo, K., Inada, Y., Hayakawa, K.: *In situ* Tissue Engineering for tracheal reconstruction using a luminal remodeling type of artificial trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg* **138**: 811-9(2009)

中村達雄, 大森孝一, 金丸真一: 気道の再生治療. *治療学* **43**: 49-52(2009)

Araki, M., Tao, H., Sato, T., Nakajima, N., Hyon, S.-H., Nagayasu, T., Nakamura, T.: Development of a new tissue-engineered sheet for reconstruction of the stomach. *Artificial Organs* **33**: 818-826(2009)

Ichihara, S., Inada, Y., Nakada, A., Endo, K., Azuma, T., Nakai, R., Tsutsumi, S., Kurosawa, H., Nakamura, T.: Development of new nerve guide tube for repair of long nerve defects. *Tissue Eng Part C Methods* **15**: 387-402(2009)

市原理司, 中村達雄, 稲田有史, 黒澤 尚: 新しい人工神経の開発. *整形・災害外科* **52**: 118-119(2009)

稲田有史, 諸井慶七郎, 古家 仁, 中村達雄, 市原理司, 森本 茂: CRPS type II に対する PGA-Collagen tube を使用した生体内再生治療. *整形・災害外科* **52**: 694(2009)

Omokawa, S., Fujitani, F., Inada, Y.: Dorsal radiocarpal ligament capsulodesis for chronic dynamic lunotriquetral instability. *J Hand Surg Am.* **34**: 237-243(2009)

稲田有史, 中村達雄, 市原理司, 諸井慶七郎, 橋爪圭司, 古家 仁, 森本 茂: 末梢神経損傷に対する polyglycolic acid-collagen tube (PGA-C チューブ) を用いた生体内再生治療の一例 - 効用から効果への治療のエビデンス確立へ向けて. *治療学* **43**: 676-680(2009)

稲田有史: 四肢筋区画症候群. *救急医学* **33**: 895-899(2009)

稲田有史, 中村達雄, 市原理司, 諸井慶七郎, 橋爪圭司, 古家 仁, 森本 茂: 末梢神経に対する生体内再生治療. *ペインクリニック* **30**: S396-S402(2009)

Umeda, H., Kanemaru, S., Yamashita, M., Ohno, T., Suehiro, A., Tamura, Y., Hirano, S., Nakamura, T., Omori, K., Ito, J.: *In situ* tissue engineering of canine skull with guided bone regeneration. *Acta Otolaryngol* **11**: 1-10(2009)

大野 覚, 中谷宏章, 弘瀬かほり, 松本 昇, 伊藤悟志, 山西伴明, 西岡明人, 小川恭弘: 下咽頭癌に対する放射線併用超選択的動注化学療法. *耳鼻咽喉科臨床* **102**: 749-754(2009)

Ohno, S., Hirano, S., Tateya, I., Kanemaru, S., Umeda, H., Suehiro, A., Kitani, Y., Kishimoto, Y., Kojima, T., Nakamura, T., Ito, J.: Atelocollagen sponge as a stem cell implantation scaffold for the treatment of scarred vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **118**: 805-810(2009)

Kishimoto, Y., Hirano, S., Suehiro, A., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Ito, J.: Effect of exogenous hepatocyte growth factor on vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **118**: 606-11(2009)

伊藤和夫, 田畑泰彦, 茂野啓示: 「デンティンボンディングを再評価する」 *歯界展望* **114**: 672-696(2009)

- 中村達雄, 稲田有史, 瀬尾憲司, 照光 真, 茂野啓示: 顎顔面領域の神経損傷に対する新たなアプローチ-PGA-C tube 人工神経管を用いた神経再生. 歯界展望 **114**: 1167-1187(2009)
- Nakada, A., Fukuda, S., Ichihara, S., Sato, T., Itoi, S., Inada, Y., Endo, K., Nakamura, T.: Regeneration of central nervous tissue using a collagen scaffold and adipose-derived stromal cells. Cells Tissues Organs **190**: 326-335(2009)
- Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., Shigeno, K., Shionoya, Y., Nakamura, T.: Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. Molecular Reproduction and Development **77**: 2(2010)
- Yoshida, S., Hayakawa, K., Yamamoto, A., Aida, N., Okano, S., Matsushita, H., Kanda T., Yamori Y., Yoshida N., Hirota, H.: Symmetrical central tegmental tract(CTT) hyperintense lesions on magnetic resonance imaging in children. Eur Radiol **19**: 462-469(2009)
- Ogura, A., Hayakawa, K., Miyati T., Maeda, F.: Effects of Iodinated Contrast Agent on Diffusion Weighted Magnetic Resonance Imaging. Acad Radiol **16**: 1196-1200(2009)
- Ogura, A., Hayakawa, K., Miyati, T., Maeda, F., Miyai, A., Saeki, F., Murata, T.: Differentiation of hepatic tumors by use of image contrast with T2-weighted MRI. Radiol Phys Technol **2**: 54-57(2009)
- 早川克己, 吉田昌子, 山本 憲, 谷掛雅人: 小児中枢神経系救急疾患の画像診断. 日本小児放射線学会雑誌 **25**: 29-42(2009)
- 桑鶴良平, 早川克己, 鳴海善文, 林 宏光: 造影剤の適正使用推進ガイド-FAQ [第 12 回] 最終回 造影剤添付文書の「適用上の注意」. 臨床画像 **3** **25**: 324-327(2009)
- 早川克己: 特集 脳・神経系の画像診断Ⅲ. 疾患各論 低酸素性虚血性脳症. 小児科診療 **72**: 545-557(2009)

2) 著 書

- 中村達雄: 食道・気管. 「遺伝子医学 MOOK13 患者までとどいている再生誘導治療」(編集: 田畑泰彦, 発行: 株式会社メディカルドゥ, 全 308 頁)37-41(2009)
- 稲田有史, 中村達雄, 市原理司, 諸井慶七郎, 橋爪圭司, 古家 仁, 森本 茂: 末梢神経損傷に対する polyglycolic acid-collagen tube(PGA-C チューブ)を用いた生体内再生治療の一例-効用から効果への治療のエビデンス確立へ向けて-. 「遺伝子医学 MOOK13 患者までとどいている再生誘導治療」(編集: 田畑泰彦, 発行: 株式会社メディカルドゥ, 全 308 頁)76-80(2009)
- 稲田有史: CRPS の治療法-神経再生療法-. 複合性局所疼痛症候群 CRPS(complex regional pain syndrome)(眞下節, 柴田政彦・編, 真興交易(株)医書出版部, 東京)210-213(2009)
- 茂野啓示, 桑田正博, 共著: 歯界展望別冊「実践咬合調整」2009 年 5 月(医歯薬出版株式会社, 全 128 頁)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 中村達雄: iPS 細胞研究の展望と問題点. 福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座・第 12 回耳鼻咽喉科再生医学研究会(2009.4.20 福島)
- 中村達雄: in situ Tissue Engineering を用いた気管・気管支の再建. 第 61 回日本気管食道科学会総会(2009.11.5-6)

横浜)

荒木政人, 中島直喜, 須賀井一, 玄 丞休, 七島篤志, 日高重和, 澤井照光, 國崎真己, 飛永修一, 永安 武, 中村達雄: 肝切離面に対する新しい癒着防止材の開発. 第109回日本外科学会総会(2009.4.2-4 福岡)

荒木政人, 中村達雄, 中島直喜, 須賀井一, 玄 丞休, 高木克典, 永安 武: 医工学の融合による新規医療材料の開発と再生医療. 第4回長崎障害者支援再生医療研究会(2009.9.29 長崎)

稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 森本 茂, 市原理司: 正中, 尺骨神経欠損に対するPGA-Collagen tubeを用いた生体内再生治療の中期結果. 第52回日本手の外科学会学術集会(2009.4.16-17 東京)

稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 森本 茂, 市原理司: CRPSの病態と治療-PGA-Collagen tubeを利用した生体内再生治療の結果-. 第52回日本手の外科学会学術集会(2009.4.16-17 東京)

稲田有史: 生体内再生による末梢神経再生医療の最前線. エーザイ株式会社MR実践研修会(2009.5.22 奈良)

稲田有史: 四肢CRPSの侵襲的治療: 高位切断の是非(ディベート). 第7回整形外科痛みを語る会(2009.7.4-5 福岡)

稲田有史: CRPSと診断された末梢神経損傷後神経因性疼痛に対する生体内再生治療の異なる転帰. 日本ペインクリニック学会第43回大会(2009.7.16-18 名古屋)

稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 古家 仁, 橋爪圭司: CRPSの病態と治療-PGA-Collagen tubeを利用した生体内再生治療の結果-. 第31回日本疼痛学会(2009.7.16-18 名古屋)

稲田有史: マイクロサージャリーによる究極の再建. 第1回日本重度四肢外傷セミナー(2009.7.18-19 北海道)

稲田有史, 諸井慶七郎, 古家 仁, 中村達雄, 森本 茂: ピーチボールによる右膝内障に対する関節鏡手術後にCRPSを生じた1例. 第12回奈良スポーツ医学研究会(2009.7.25 奈良)

稲田有史: 神経因性疼痛に対する外科的治療の実態-ケアからリハビリまで-. 第4回佐賀整形外科手術侵襲・疼痛研究会(2009.8.8 佐賀)

諸井慶七郎, 稲田有史, 森本 茂, 中村達雄: 外科治療が著効した末梢神経障害が原因であった小児CRPS. 第20回日本末梢神経学会学術集会(2009.9.4-5 埼玉)

稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 古家 仁, 橋爪圭司, 森本 茂: 遊離橈骨前腕皮弁採取後CRPSと診断された2症例に対する生体内再生治療. 第36回日本マイクロサージャリー学会学術集会(2009.10.22-23 徳島)

稲田有史: 末梢神経障害性疼痛に対する生体内再生治療の適応と其中期成績...2002年から7年間を経過して(特別講演). 第10回北海道機能神経外科研究会(2009.11.21 札幌)

大野 覚: 瘢痕声帯治療における足場材料の検討. 第14回京都耳鼻咽喉科研究会(2009.4.11 京都)

大野 覚, 平野 滋, 楯谷一郎, 金丸眞一, 梅田裕生, 末廣 篤, 木谷芳晴, 岸本 曜, 児嶋 剛, 伊藤壽一: 組織工学的手法による声帯再生: 足場材料としてのテルダーミス(R)の有用性. 第110回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(2009.5.14 東京)

Ohno, S., Hirano, S., Tateya, I., Kanemaru, S., Ito, J.: Collagen sponge as a cell transplantation scaffold for the treatment of vocal fold scarring: An in vitro preliminary study. The 89th Annual Meeting of The American Broncho-Esophagological Association. (2009.5.28-29 U.S.A.)

塩谷伊毅, 砂田勝久, 松野智宣, 佐藤田鶴子, 中村達雄: Polyglycolic acid-collagen tubeで修復したイヌ下歯槽神経の再生に星状神経節ブロックが及ぼす影響. 平成21年度日本歯科大学歯学大会・総会(2009.6.6 新潟)

塩谷伊毅, 砂田勝久, 中村達雄: イヌ星状神経節アルコールブロックは口腔周囲の血流を増加させる. 第37回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(2009.10.10 名古屋)

- Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., Shigeno, K., Shionoya, Y., Kida N., Honda M., Nakamura, T.: Generation of canine induced pluripotent stem cells. Reprogramming Cell Fate Basic Biology and Medical Perspectives (2009.12.11-13 Italy)
- 中田 顕, 稲田有史, 遠藤克昭, 中村達雄: 脂肪組織由来幹細胞とコラーゲンの足場を用いた in situ Tissue Engineering と中枢神経再生の試み. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会 (2009.11.16-17 京都)
- Fujikawa, T., Nakamura, T., Inoue, K., Tanida, S., Endo, K.: Consideration by 3-dimensional motor analysis of ambulatory function during the process of artificial nerve regeneration in dogs. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (2009.7.27-8.1 Kyoto)
- 吉田昌子, 早川克己, 山本 憲, 神田豊子, 家森百合子, 吉田菜穂子, 廣田陽代, 岡野創造: 脳性麻痺児における錐体路と感覚路の拡散テンソル画像による量的検討. 第 38 回日本神経放射線学会 (2009.2.5 水戸)
- 谷掛雅人, 吉田昌子, 早川克己, 山下靖英: 肝細胞癌による胆道閉塞に対し multi-stenting を施行した 1 例. 日本 INTERVENTIONAL RADIOLOGY 学会第 25 回関西地方会 (第 46 回関西 INTERVENTIONAL RADIOLOGY 研究会) (2009.2.21 大阪)
- 早川克己: 特別講演 放射線診療におけるリスクマネジメント. 第 61 回撮影技術セミナー (2009.2.25 京都)
- 早川克己, 谷掛雅人, 吉田昌子, 浦田洋二, 森口喜生, 森本泰介: CT-Mammogram の 3 次元シネビューイングによる乳癌広がり診断の検討. 第 291 回日本医学放射線学会関西地方会 (第 363 回レントゲンアーベント) (2009.2.28 大阪)
- 星合壮大, 早川克己, 谷掛雅人, 津田 匠, 山本栄司, 山野 修, 浦田洋二: 術前診断が困難であった腸間膜デスマイドの一例. 第 291 回日本医学放射線学会関西地方会 (第 363 回レントゲンアーベント) (2009.2.28 大阪)
- 大野 豪, 早川克己, 谷掛雅人, 平岡泰三, 森本泰介, 水本雅己, 松岡伸英: 当院で経験した pinch off 症候群の 2 例. 第 291 回日本医学放射線学会関西地方会 (第 363 回レントゲンアーベント) (2009.2.28 大阪)
- 立入誠司, 早川克己: メタストロン治療-当院の初期治療経験. 第 27 回京都放射線腫瘍研究会 (2009.3.7 京都)
- 早川克己: 特別講演 放射線診療におけるリスクマネジメント. 第 238 回 Open Film Conference (2009.3.19 群馬)
- 早川克己: 特別講演 脳低酸素虚血性脳症の MRI による画像診断. 第 2 回みやこ小児神経臨床懇話会 (2009.4.4 京都)
- 早川克己: 「ナースのための IVR の実際と看護」解説 副作用・合併症 (major, minor), 副作用発生時の処置法. 第 37 回京滋 IVR 懇話会 (2009.4.11 京都)
- 吉田昌子, 早川克己, 岡野創造, 神田豊子, 家森百合子, 吉田菜穂子, 廣田陽代: 脳性麻痺児における脳 MRI 所見-その多様性と臨床的意義. 第 68 回日本医学放射線学会総会 (2009.4.16-19 横浜)
- 大野 豪, 谷掛雅人, 早川克己, 山本栄司, 森本泰介, 浦田洋二, 山野 剛: 比較的稀な虫垂疾患の CT 画像. 第 68 回日本医学放射線学会総会 (2009.4.16-19 横浜)
- 早川克己, 浦田洋二, 森口喜生, 吉田昌子, 山本 憲, 河井可奈江, 平岡泰三, 山野 剛, 森本泰介: MDCT-Mammogram による乳癌広がり診断能の検討. 第 68 回日本医学放射線学会総会 (2009.4.16-19 横浜)
- 崔 朝理, 越智純子, 吉田昌子, 平岡泰三, 谷掛雅人, 早川克己, 森口喜生, 森本泰介, 浦田洋二, 山野 修: 乳癌 (浸潤性小葉癌) のマンモ CT による存在診断および広がり診断の検討. 第 68 回日本医学放射線学会総会 (2009.4.16-19 横浜)
- 早川克己: 講演 造影剤腎症について. テルモ (株) 京都支店内 MR 研修講演会 (2009.4.21 京都)
- 吉田昌子, 早川克己, 神田豊子, 家森百合子, 吉田菜穂子, 廣田陽代: 脳性麻痺児における錐体路と感覚路の拡散

テンソル画像による量的検討. 第 51 回日本小児神経学会総会(2009.5.28-30 米子)

早川克己, 谷掛雅人, 吉田昌子: 造影剤による腎障害－造影剤腎症. 第 54 回(社)日本透析医学会学術集会・総会(2009.6.5 横浜)

早川克己: ミニレクチャー CT マンモグラフィ. 第 29 回京奈臨床画像カンファレンス(2009.6.20 京都)

谷掛雅人, 吉田昌子, 崔 朝理, 早川克己: 整復術にて救命しえた成人腸重積の 1 例. 日本 INTERVENTIONAL RADIOLOGY 学会第 26 回関西地方会(第 47 回関西 INTERVENTIONAL RADIOLOGY 研究会)(2009.6.27 大阪)

早川克己, 谷掛雅人, 吉田昌子, 新谷弘幸, 森本泰介: 肝臓 IVR に伴う造影剤腎症の検討. 第 45 回日本肝臓研究会(2009.7.3-4 福岡)

佐藤文恵, 吉田昌子, 谷掛雅人, 早川克己, 松尾宏一, 山本栄司, 森本泰介, 浦田洋二: 壊疽性胆嚢炎の 3 例. 第 292 回日本医学放射線学会関西地方会(第 364 回レントゲンアーベント)(2009.7.4 大阪)

崔 朝理, 吉田昌子, 谷掛雅人, 早川克己, 浦田洋二: 腸重積を合併した Cronkhite-Canada 症候群の一例. 第 292 回日本医学放射線学会関西地方会(第 364 回レントゲンアーベント)(2009.7.4 大阪)

吉田昌子, 谷掛雅人, 崔 朝理, 早川克己, 小松弥郷: 副腎静脈サンプリングの術前プランニングにおけるダイナミック造影 CT の有用性. 第 292 回日本医学放射線学会関西地方会(第 364 回レントゲンアーベント)(2009.7.4 大阪)

早川克己, 谷掛雅人, 山本 憲, 吉田昌子, 越智純子: 水溶性造影剤を用いた小児腸重積の整復. 第 38 回日本 IVR 学会総会(2009.8.5-7 大阪)

谷掛雅人, 早川克己, 吉田昌子, 崔 朝理, 山本栄司, 松尾宏一, 森本泰介: 急性上腸間膜動脈閉塞症の IVR: 手技, 適応, 治療成績について. 第 38 回日本 IVR 学会総会(2009.8.5-7 大阪)

早川克己: 造影剤. 第 38 回断層映像研究会(2009.10.9-10 米子)

大野 豪, 吉田昌子, 谷掛雅人, 早川克己, 鹿江 寛, 田中千晶, 浦田洋二, 池永 稔: 脊椎原発巨細胞腫の 1 例. 第 293 回日本医学放射線学会関西地方会(第 365 回レントゲンアーベント)(2009.10.17 大阪)

星合壮太, 吉田昌子, 谷掛雅人, 早川克己, 安井良僚, 山本栄司, 森本泰介, 樋野陽子, 浦田洋二: Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas の一例. 第 293 回日本医学放射線学会関西地方会(第 365 回レントゲンアーベント)(2009.10.17 大阪)

倉田靖桐, 吉田昌子, 谷掛雅人, 早川克己, 安井良僚: 造影剤ショックにより CT 上著明な腸管浮腫を認めた 1 例. 第 293 回日本医学放射線学会関西地方会(第 365 回レントゲンアーベント)(2009.10.17 大阪)

大野 豪, 吉田昌子, 谷掛雅人, 早川克己, 鹿江 寛, 田中千晶, 浦田洋二, 池永 稔: 腰痛を来した若年男性の 1 例. 第 65 回比叡山画像カンファレンス(2009.10.22 京都)

早川克己: 講演 放射線部門におけるリスクマネジメント. 京都府放射線技師会 第 525 回研修会(2009.11.17 京都)

町口敏彦, 中村達雄: Conditioned media of vascular endothelial(VEC)and tubular epithelial cells(TEC)lead in vivo glomerulogenesis using TECs and mesenchymal stem cells. 第 52 回日本腎臓学会学術総会(2009.6.4 横浜)

2) 講演・シンポジウム

中村達雄: In situ Tissue Engineering(生体内再生医療)の整形外科領域への臨床応用. 第 27 回松戸整形外科医会教育研修講演会(2009.5.27 松戸)

茂野啓示：審美修復治療の成功要件－再生医療を踏まえて」. 札幌技工士会学術講演(2009.1.18 札幌)

茂野啓示：インプラント修復治療の基本設計に対する考え方及びインプラント治療における再生医療への取り組み.

第 118 回日本補綴歯科学会学術大会講演(2009.6.6 京都)

茂野啓示：再生医療を基礎にした，歯周形成外科の手技. 岡山 ODC study club 講演会(2009.10.18 岡山)

附属再生実験動物施設

Laboratory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 長澤 丘司

Acting Head, Prof. Takashi Nagasawa

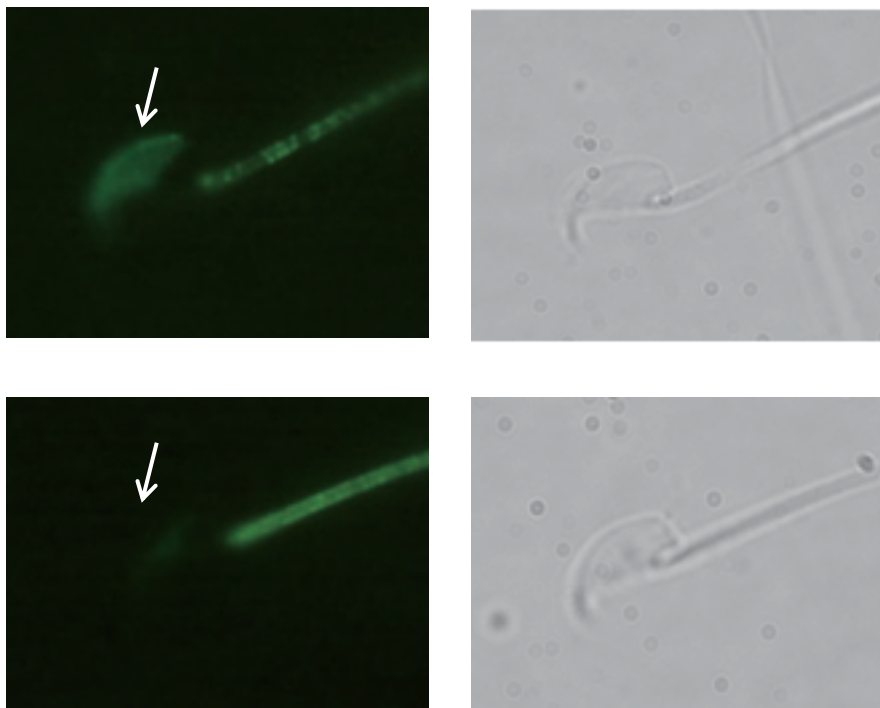
【再生実験動物施設の現状について】

附属再生実験動物施設では、平成20年度イヌ：121頭、ネコ：4匹、サル：4頭、ウサギ：23羽、チンチラ：3匹、ラット：131匹、マウス：12,891匹が実験動物として飼養された(京都大学動物実験委員会「動物実験に関する自己点検・評価報告書」平成21年7月版による)。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を専任准教授1名・技術職員2名・非常勤職員19名で行っている。

当研究所で動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分の理解と配慮をして実施する事が大前提である。この原則を周知・徹底させるため、動物実験に従事する者は、動物実験に関する法規制・内規、動物実験実施にあたっての原則、実験動物の取り扱い方等についての全学講習および所内講習を受講することが義務付けられている。南部総合研究実験棟・動物飼育室を利用する者は、これに加えて、SPF(Specific Pathogen Free)マウスの取り扱いについて実地講習を受けなければならない。また、動物実験を実施するには、動物実験計画書を当研究所の動物実験委員会に提出し、厳格な審査を受け承認を得ることが必要である。

南部総合研究実験棟(2002年12月設置、再生医科学研究所、ウイルス研究所、医学部の3部局による共同研究実験棟)マウス飼育室は稼働を開始してから7年が経過した。現在、SPFマウス飼育室全16室中、再生研：12室、ウイルス研：3室、医学部：1室、を使用している。本マウス飼育棟ではSPFマウスのみが飼育され、動物実験が行われている。搬入できるマウスは、指定実験動物供給業者から購入可能なSPFマウス及び当施設等において体外受精・受精卵移植によるクリーンアップを受けSPF化されたマウスのみ限定されている。また、飼育室に持ち込む生物試料(細胞・血清等)も、事前に当施設による検疫を受けることが義務付けられた。これらの厳格なる管理の下、現在までのところ、感染事故等の深刻な問題は起きていない。ただ、共同実験棟マウス飼育室においては、SPFマウスの微生物汚染を防止するためには、動物飼育員、利用者各人の十分な注意が必要であるが、多数の人間が出入りする以上、いつ何時汚染事故が生じるかもしれない。不幸にして、幾つかの他校動物実験施設で微生物汚染事故が発生したことが報告されている。それらの苦い経験から、SPFマウスの微生物汚染の発生原因、汚染拡大様式、汚染除去法などを十分に学び、万一汚染が生じた時のことも想定し、汚染を最小限度に封じ込める等の対策について、本動物施設でも予め具体的な方策を立てておくことが必要であろう。一方、稼働し始めて明らかになってきた設計、建築、設備上の種々の問題点、すなわち、室温・風量制御、凍結防止対策の不備等も徐々に把握されつつあり、対応可能になってきた。また、施設運営に関しても、3部局共同の建物であるため、当初、運営・予算の執行における困難さが指摘されてきたが、試行錯誤ながらも克服されつつある。ただ、独立法人化後の運営交付金の削減により、安定した施設運営が困難になりつつあり、この様な恒常的施設運営のための別枠の予算措置が講じられることを期待するものである。

東館動物施設は、副施設長による管理のもと、時代の要請に適合した飼育施設に変貌しつつある。すなわち、指紋認証制による利用者登録の導入、サル飼育室の改良、遺伝子改変動物飼育に適合したマウス・ラット室の改造等



精子受精能獲得(capacitation)誘導による GPI アンカー型 GFP の shedding. methyl- β -cyclodextran 処理により精子頭部の蛍光が消失した(矢印). このことから, 精子受精能獲得と GPI アンカー型タンパク質遊離との相関が示唆された. 上段: 未処理精子, 下段: 処理精子. 尾部の蛍光はバックグラウンド.

である. また, イヌについても, 飼育数と出入の厳密なる把握により, スムーズな登録と狂犬病予防注射が可能になった. しかしながら, 施設・備品の老朽化が進行しつつあり, 問題発生時に, まさに自転車操業的に対応しているのが現状である. また, 毎年度予算的にも逼迫しており, このような対応がいつまで続けられるか予測不能である. 今後は, 大規模な改装を念頭においた施設運営が望まれる.

【研究概要】

再生実験動物施設は, 再生医科学研究所の附属施設として, 研究実施に不可欠である動物実験に関する全般的な管理業務(再生研の動物実験計画書の審査に係る業務, 動物実験に関する講習会の開催, 再生研における実験動物の維持, 管理など)と共に, 一研究分野として以下の研究活動を行っている.

研究テーマ 1. GPI アンカー型タンパク質の代謝メカニズムと受精

現在の当研究室のメインテーマは, 膜結合タンパク質の一種であるグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型タンパク質(GPI-AP)の代謝メカニズムの解明とその生殖細胞系列での生物学的意義の探究である. このため, まず, 個体内での GPI-AP の局在を網羅的に解析するために, GPI アンカー型 GFP レポーター蛋白質(EGFP-GPI)を構築した. これを導入したトランスジェニックマウスでは, 予想以上に EGFP-GPI が, 外分泌腺や精巣において遊離していることを見出した(Kondoh G. et al. *FEBS lett.* 458, 299-303, 1999).

以後, この現象に特に着目し, マウス精巣生殖細胞より GPI-AP 遊離因子の精製・構造解析を行った. その結果, この因子のひとつとしてアンギオテンシン変換酵素(ACE)を単離した. すなわち, この酵素には, アンギオテンシン I やブラディキニンなどの昇圧ペプチドの活性を制御するのみならず, 多くの GPI-AP を細胞膜より遊離する

新たな活性を持つことが明らかとなった。また、今回同定した活性は、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼとしてこれらのペプチドを分解するための活性中心とは別の部位に位置し、また、GPI-AP のペプチド部分ではなく、GPI アンカーそのものを切断することも突き止めた。一方、ACE ノックアウトマウスでは、精子-透明体結合不全による雄性不妊が知られている。そこで、このマウスの精子をジペプチダーゼ不活性型 ACE で処理したところ受精能が回復した。このことから、ACE は in vivo で GPI-AP 遊離活性(GPIase)があり、この活性をもって受精に重要な役割を担っていることが示唆された(Kondoh G. et al. *Nat. Med.*, 11, 160-166, 2005)。

そこで我々は、ACE の受精における機能をさらに追究するためジペプチダーゼ不活性型 tACE(精巣型アイソフォーム)を導入したトランスジェニックマウス(Tg マウス)を作出した。その結果、作出した Tg マウス家系のいずれにおいても体外受精における受精率の低下および精子-卵透明帯結合の障害がみられた。また、同マウスの精巣、精巣上体内での GPIase 活性およびジペプチダーゼを測定したところ、精巣上体内でのジペプチダーゼ活性が特異的に低下していた。このことから、変異型 tACE は精巣上体でいわゆるドミナントネガティブ分子として作用していると考えられた。すなわち tACE は、GPIase 活性により精子上で機能すると同時に精巣上体内においてジペプチダーゼとして機能し、二元的に受精に関与していることが示唆された(Deguchi E. et al. *Biol. Reprod.*, 77, 794-802, 2007)。

また、本年度は tACE の酵素活性に対する糖鎖修飾の影響を検討した。tACE の N 末端側には、体細胞型(sACE)にはない 36 アミノ酸残基からなる特異領域がある。この領域はセリン・スレオニンリッチで、O 型糖鎖修飾を受けることが報告されていたが、その生物学的意義は不明であった。そこで我々は、この領域の O 型糖鎖が結合すると予想された 9 か所のスレオニン残基を全てアラニンに置換した変異体を作製した。この変異体では、O 型糖鎖の付加が検出限界以下であったが、いずれの活性も変異体と野生型とで有意差はなかった。一方、野生型 tACE を CHO 細胞で発現させて得た分子の両活性を、COS7 細胞由来分子と比較したところ、ジペプチダーゼ活性は同等であったが、GPIase 活性は CHO 由来分子のほうが有意に高かった。そこで、これらの分子の糖鎖プロファイリングを、レクチンアレイ(LecChipTM)を用いて解析した。その結果、両分子間で糖鎖プロファイリングの違いが認められた。これらのことから、O 型糖鎖の有無は tACE の両活性の基盤に影響は与えないものの、そのプロファイリングの違いは、GPIase 活性の高低を左右する可能性が示唆された(Kondoh G. et al. *J. Biochem.*, 145, 115-121, 2009)。

研究テーマ 2. 遺伝子改変マウス作出技術の簡易化

遺伝子改変マウスの作出には、何段階ものプロセスが存在し、多くの時間・労力・経費を必要とする。なかでも特に問題になるのが、ターゲティングベクターの作製、ES 細胞の培養そしてキメラマウス作出の諸段階であろう。我々は、これらのステップにおける“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきた。ターゲティングベクターの作製においては、BAC クローンに基づく大腸菌内組み換えシステム(リコンビネーリング)を採用し、従来に比べて四分の一の時間短縮に成功した。また、キメラマウスの作出においては、凝集法を改良し、高価なインジェクション機器の購入や煩雑なメンテナンスのいらぬ方法を可能にした(Kondoh G. et al. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 39, 137-142, 1999)。これらの技術集約のもとに、過去 5 年間で 13 件の遺伝子改変マウス作出に参加した。

We have previously found that the angiotensin-converting enzyme (ACE) carries GPI-anchored protein releasing activity (GPIase) as well as dipeptidase activity. Testicular ACE (tACE), the male germinal specific isozyme,

plays a crucial role in male fertilization. The amino-terminal region of this isozyme is different from that of somatic isozyme (sACE) and contains potential O-linked glycosylation sites. By multiple mutagenesis after an *in silico* prediction, amino acid residues acquiring O-glycans were assigned. Both GPIase and dipeptidase activities were compared between O-glycan null mutant and wild-type molecules, but no differences were found. Furthermore, the wild-type tACE was produced in two different cells (COS7 and CHO) and its activities compared. The GPIase activity, but not dipeptidase, was apparently higher for CHO-derived molecule than COS7. Sensitivity to neuraminidase and O-glycosidase digestions and the profile of glycosylation were quite different between these two molecules. Moreover, serial digestions with neuraminidase and O-glycosidase have no influence on GPIase activity of both molecules, suggesting that the sialylation and the presence of O-glycan has no influence on tACE enzyme activities, while the set of glycans modulate GPIase activity.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Kondoh, G.**, H. Watanabe, Y. Tashima, Y. Maeda, T. Kinoshita : Testicular angiotensin-converting enzyme with different glycan modification : characterization on glycosylphosphatidylinositol-anchored protein releasing and dipeptidase activities. *J. Biochem.*, **145**, 115-121 (2009).
- Watanabe, Y., K. Inoue, A. Okuyama-Yamamoto, N. Nakai, J. Nakatani, K-I Nibu, N. Sato, Y. Ilboshi, K. Yusa, **G. Kondoh**, J. Takeda, T. Terashima, T. Takumi : Fezf1 is required for penetration of the basal lamina by olfactory axons to promote olfactory development. *J. Comp. Neurol.*, **515-5**, 565-584 (2009).
- Mukai, A., T. Kurisaki, S-B. Sato, T. Kobayashi, **G. Kondoh**, N. Hashimoto : Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells. *Exp. Cell Res.*, **315**, 3052-3063 (2009).
- Shoji, M., T. Tanaka, M. Hosokawa, M. Reuter, A. Stark, Y. Kato, **G. Kondoh**, K. Okawa, T. Chujo, T. Suzuki, K. Hata, S-L. Martin, T. Noce, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, H. Sasaki, R-S Pillai, N. Nakatsuji, S. Chuma. : The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germ line. *Dev. Cell*, **17**, 775-787 (2009).

2) 著 書

- 近藤 玄：受精担当分子としてのアンギオテンシン変換酵素：GPI アンカー型タンパク質遊離機能との相関。医学のあゆみ「レニン・アンギオテンシン系のすべて」228 巻 5 号, p513-516, 2009.

◆ 学会等の発表 ◆

学会・研究会発表

- 渡邊仁美, 谷 妙子, 村上 惇, 折橋 郁, 近藤 玄：マウス精子における GPI アンカー型タンパク質動態を追跡するためのレポーターマウスの作出と解析。第 56 回日本実験動物学会, 2009.5.14~5.16, さいたま市。
- 竹村浩昌, 東城博雅, 近藤 玄：遺伝子変異マウスを用いたホスホリパーゼ B/リパーゼの生理的機能の解析。第

82 回日本生化学会, 2009.10.21~10.24, 神戸市.

近藤 玄, 渡邊仁美, 折橋 郁: マウス精子における GPI アンカー型タンパク質動態の追跡と受精能獲得との相関. 第 32 回日本分子生物学会, 2009.12.9~12.12, 横浜市.

(文責: 近藤 玄)

附属幹細胞医学研究センター Stem Cell Research Center

霊長類胚性幹細胞研究領域 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research

分野主任 准教授 末盛 博文

Assoc. Prof. Hirofumi Suemori

【研究概要】

ヒト ES 細胞株の樹立と特性解析

霊長類胚性幹細胞研究領域ではヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに 5 株のヒト ES 細胞株を樹立し、うち 3 株は 2004 年 3 月から、2 株は 2009 年 4 月から分配を行っている。これまでに 50 件以上の研究計画に対して細胞株を分配し多くの研究成果が上げられている。

イギリス Sheffield 大学などの機関を中心とした International Stem Cell Initiative において、ヒト ES 細胞の医療応用に際して必要となる特性解析の標準化等が進められており、我々もこの共同研究に参加している。現在、ES 細胞の比較解析などより高精度に行うために、培養条件の標準化に向けての作業が行われている。

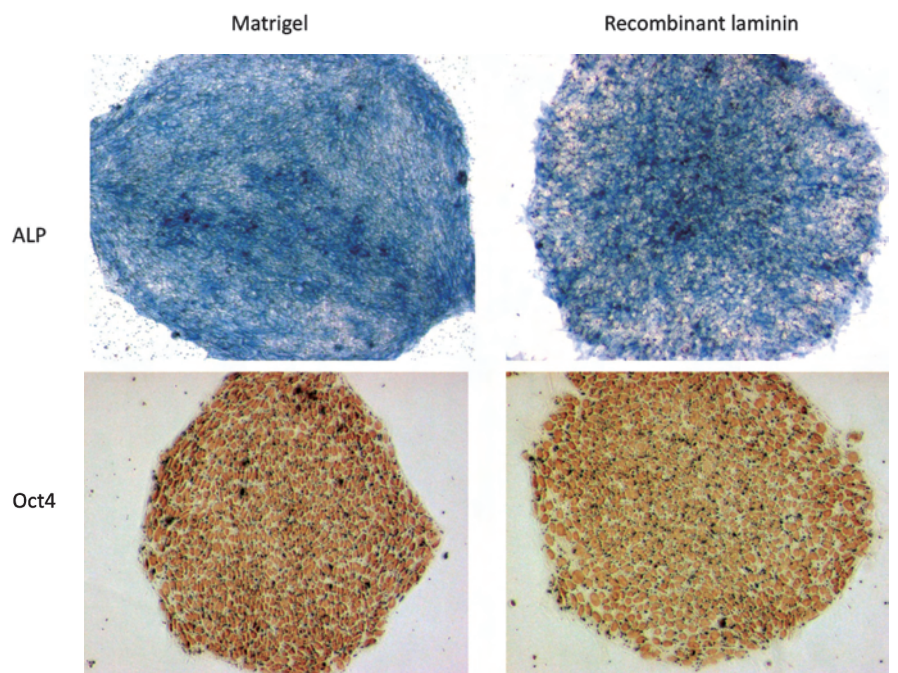
ヒト ES 細胞の未分化維持に寄与するラミニンアイソフォームの機能解析

ヒト ES 細胞や iPS 細胞を医療応用する上で、その安全性の高い培養法の確立が必要不可欠である。そのため血清などの成分が不確定で品質管理が困難な材料の使用は好ましくない。そのため成分が明らかな培養液 (defined medium) の開発が進められており、実用的と考えられるものも作られるようになってきている。一方、細胞が接着する足場、基質に関しては未だ十分な性能を発揮するものが得られておらず、マウスのガン細胞から抽出したマトリックス混合物であるマトリゲルが標準的に用いられている。そのため、培養液同様に品質管理可能な培養基質の開発が必要である。我々は、ヒト ES 細胞でのインテグリンの発現パターンから、ES 細胞の接着に重要な機能を持つと考えられるラミニンアイソフォームを遺伝子組み換えにより作製し、その ES 細胞の増殖や未分化性維持に及ぼす影響を解析した。その結果、インテグリンの発現パターンに対応するラミニン 332, 511 が ES 細胞の維持に有効であることがわかった。これらは組み換え蛋白質として生産可能であるため品質管理も比較的容易であり、ES 細胞の医療応用に大きく寄与すると考えられる。

Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center.

Establishment and analysis of human ES cell lines.

Embryonic stem (ES) cell lines are pluripotent stem cell lines which can be propagated indefinitely in culture retaining their differentiation potency into every cell types of tissues in the body. Since establishment of human ES cell lines were reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells are expected. In Japan, there have been many demands for use of human ES cells on basic and pre-clinical researches. We started to establish human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established 5 human ES



組み換えラミニン上で培養したヒトES細胞(右)は未分化状態を維持している。形態や増殖も従来のマトリゲル上で培養したもの変わらない。

cell lines. We have distributed these cell lines to over 50 researches.

Function of laminin isoforms in the maintenance of human ES cells.

Human embryonic stem cells (hESCs) are thought to be promising cell sources for cell transplantation therapy. For in such a clinical application, hESCs should be manipulated using appropriate and qualified materials. While several xeno-free and/or defined media for the culture of human embryonic stem cells(hESCs) have been developed, most of those media still require using Matrigel, a basement membrane derived from mouse EHS tumor, as a basal scaffold on the surface of the culture vessels. In this study, we focused the laminin, which is a major component of Matrigel, and examined the efficacy of recombinant human laminin(rhLM) isoforms on the undifferentiated growth of hESCs. When the hESCs were seeded onto rhLM isoforms, the cells indeed adhered markedly to rhLM-332, and to rhLM-511 and rhLM-111 to a lesser extent. The hESCs logarithmically proliferated on those three rhLMs for several passages while preserving their pluripotency. On the contrary, the hESCs barely adhered on rhLM-211 and rhLM-411 and did not show the significant growth. These results show that rhLM-111, -332, and -511 are good substrates to expand undifferentiated hESCs due to their high affinity to integrin $\alpha 6 \beta 1$ expressed on hESCs.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Nishigaki T, Teramura Y, Suemori H, Iwata H. Cryopreservation of primate embryonic stem cells with chemically-defined solution without Me(2)SO. Cryobiology. (2009) Oct 24. (in print)

- Fukumitsu K, Ishii T, Yasuchika K, Amagai Y, Saitoh M, Kawamoto T, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Establishment of a cell line derived from mouse fetal liver that have the character to promote the hepatic maturation of mouse embryonic stem cells by co-culture method. *Tissue Eng Part A*.(2009)Jun 26. (in print)
- Yamauchi K, Hasegawa K, Chuma S, Nakatsuji N, Suemori H. In vitro germ cell differentiation from cynomolgus monkey embryonic stem cells. *PLoS ONE*.**4**(4): e5338(2009)
- Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K, Mori E, Okada Y, Takahashi K, Homma K, Oyamada N, Inuzuka M, Sonoyama T, Ebihara K, Tamura N, Itoh H, Suemori H, Nakatsuji N, Okano H, Yamanaka S, Nakao K. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett*. **583**(6): 1029-33(2009)
- Mitsui K, Suzuki K, Aizawa E, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors. *Biochem Biophys Res Commun*. **388**(4): 711-7(2009)

◆ 学会等の講演 ◆

学会・研究会発表

- 末盛博文：「初めてのヒト ES 細胞。培養と分化誘導」第 8 回核ダイナミクス研究会・企画ワークショップ「遺伝情報場に迫る多角的アプローチ」(2009.6.18-20 伊豆市)
- Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, Kawasaki M, Sanzen N, Hayashi M, Kawase E, Sekiguchi K, Nakatsuji N, Suemori H. Recombinant human laminin isoforms are effective in culture of human embryonic stem cells. International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting(2009.7.8-11 Barcerona, Spain)
- Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E, Hasegawa K, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in human embryonic and induced pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting(2009.7.8-11 Barcerona, Spain)
- Hasegawa K, Jia-Ling T, Suemori H, Nakatsuji N, Kahn M, Pera F.M, Kahn M. Development of a novel xeno-free human embryonic stem cell culture system using small molecules” International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting(2009 7.8-11 Barcerona, Spain)
- Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E, Hasegawa K, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in human pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vectors American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting(2009 5.27-30 San Diego USA)
- Aizawa E, Mitsui K, Suzuki K, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. Optimization Of Vector Design For Lentiviral Gene Transfer Into Human Embryonic Stem Cells American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting (2009 5.27-30 San Diego USA)

幹細胞分化制御研究領域 Laboratory of Stem Cell Differentiation

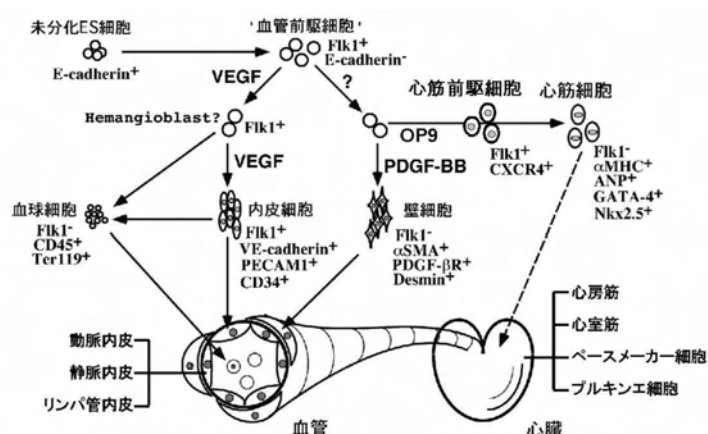
分野主任 准教授 山下 潤

Assoc. Prof. Jun K. Yamashita

【研究概要】

幹細胞分化制御研究領域では、ES 細胞(胚性幹細胞: embryonic stem cells)及び iPS 細胞(人工多能性幹細胞: induced pluripotent stem cells)を用いて、心血管系の細胞分化・再生に関する研究を行っている。

ES 細胞は、全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。この全能性(pluripotency)を in vitro において引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みが様々な臓器、細胞をターゲットに行われている。我々は、ES 細胞を用いて中胚葉由来組織である血管および心臓の分化研究を行ってきた。



血管は、内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の2種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に関連しあい血管を形作る。VEGFの受容体の一つであるFlk1は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。我々は、ES細胞を用いて in vitro において中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞(血管

平滑筋細胞およびペリサイト)を選択的に分化誘導し、最終的に血管としての高次構造を in vitro および in vivo において構築すること、いわば血管の発生過程を再現することに成功した(Yamashita, *Nature*, 2000)。この in vitro 分化系では、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が血管としての高次構造を形成する。また、中胚葉由来の細胞の一つである心筋細胞も同様に Flk1 陽性細胞から分化誘導することと共に新しい心筋前駆細胞の同定に成功している(Yamashita, *FASEB J*, 2005)。また最近では、動脈リンパ管内皮細胞分化や心筋ペースメーカー細胞などにさらに多様な心血管細胞の分化誘導を行っている(Yamashita, *Trends Cardiovasc Med*, 2007; Yanagi, *Stem Cells*, 2007 他)(図)。最近我々は、免疫抑制剤のサイクロスポリン A が Flk1 陽性中胚葉細胞に特異的に作用し、心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化を促進する、という全く新しい作用を見出した(Yan, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009)。また、血管内皮細胞分化を培養下において構成的に再現することにより、Protein kinase A が血管前駆細胞の VEGF への感受性を変化させて内皮細胞分化を促進していること(Yamamizu, *Blood*, 2009)、及び Notch と β -catenin が直接相互作用することにより動脈内皮への運命決定を行っていることを新たに示した(Yamamizu, *J Cell Biol*, in press)。

さらに、最近本研究所山中伸弥教授によって樹立された人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いて同様の実験システムを構築し、新たな心血管再生研究を開始している。ES細胞研究において蓄積したノウハウを用いていち早くマ

ウス iPS 細胞を用いた心血管系細胞の分化誘導に成功した (Narazaki, **Circulation**, 2008).

このように我々の ES 細胞を用いた in vitro 分化系は、心血管および血球という循環器系の細胞群を系統的に分化誘導することができ、心血管の発分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる。従って、この分化系を用いることにより心臓血管の発分化のメカニズムを細胞レベル、分子レベルで検討し、ノックアウトマウスの形質解析に依存していた分化の分子機構の解析を in vitro で行うという新しいアプローチが可能になったと考えられた。

現在、この ES 細胞 in vitro 分化系を用いて、以下のようなプロジェクトを遂行及び予定している。

1. ES 細胞 in vitro 分化系を用いた血管細胞分化・多様化の分子機構の解析

- 1) DNA チップを用いた網羅的血管分化関連遺伝子の同定
- 2) RNA 干渉を用いた in vitro 遺伝子機能解析系の構築 (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006)
- 3) 動静脈・リンパ管内皮特異的分化誘導と内皮細胞多様化機構の解析 (Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007; Yamamizu, **J Cell Biol**, in press)
- 4) cAMP 及び PKA による血管前駆細胞の分化能調節機構 (Yamamizu, **Blood**, 2009)
- 5) 物理的刺激の血管内皮分化多様化における意義 (Yamamoto, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2005).

2. 誘導血管細胞の血管再生への応用

- 1) 移植におけるドナー細胞の最適な分化段階の決定 (Yurugi-Kobayashi, **Blood**, 2003).
- 2) 移植細胞の遺伝子修飾による組織への動員、生着効率の改善効果の検討
- 3) 人工生体材料を用いた新しいハイブリッド人工血管の開発 (Huang, **J Artif Organ**, 2005).

3. ES 細胞からの心筋細胞の分化誘導

- 1) 2 次元培養による新しい ES 細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発と新しい心筋前駆細胞の同定 (Yamashita, **FASEB J**, 2005).
- 2) 心筋細胞 in vitro 分化系を用いた心筋分化・多様化の分子機構の解析
- 3) ES 細胞由来心筋細胞自動能形成機構の解析 (Yanagi, **Stem Cells**, 2007)
- 4) サイクロスポリン A を用いた新しい高効率心筋前駆細胞・心筋細胞分化誘導法 (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009)
- 5) 新しい心臓再生治療への応用 – 新しい心筋前駆細胞治療の開発 –

4. 霊長類 ES 細胞からの心血管分化誘導

1) サル ES 細胞からの血管分化誘導

京都大学臨床病態医科学との共同研究により、サル ES 細胞からの血管分化誘導に成功した (Sone, **Circulation**, 2003).

2) ヒト ES 細胞からの血管分化誘導

京都大学臨床病態医科学申請の輸入ヒト ES 細胞を用いた血管分化研究に参画 (Sone, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2007; Yamahara, **PLoS One**, 2008).

3) ヒト ES 細胞からの心筋細胞分化誘導

ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」(研究代表者・山下 潤, 平成 17 年 3 月 10 日文部科学大臣承認)

ヒト ES 細胞を用いた心血管分化研究を行っている。

5. 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた心血管分化再生研究

- 1) マウス iPS 細胞を用いた心血管分化系の構築 (Narazaki, **Circulation**, 2008; **Best Paper Award** in Basic Science category, *Circulation* 2008)
- 2) ヒト iPS 細胞からの心血管細胞分化誘導法の開発
- 3) iPS 細胞分化システムのケミカルバイオロジー及び創薬応用 (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008) (早稲田大学他との共同研究)

Main theme of our research : Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular development and the application to cardiovascular regeneration using *in vitro* differentiation system of embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells.

Previously, we established a novel *in vitro* vascular differentiation system of ES cells (Yamashita, **Nature**, 2000). Using ES cell-derived Flk1 (VEGF receptor-2)-positive mesodermal cells as starting material, we can induce all of the vascular cellular compartments, that is, endothelial cells, mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) and blood cells. Vessel-like structures of endothelial cell tube with mural cell attachment and blood cell inside are formed from Flk1+ cell aggregates in 3-D culture. Thus, this *in vitro* system should reproduce the early process of vascular development. And we also demonstrated that the transplanted vascular cells induced by this system could contribute to developing vasculature *in vivo*. Moreover, we have succeeded in inducing cardiomyocytes from Flk1+ cells, and identifying a novel cardiac progenitor cells (Yamashita, **FASEB J**, 2005). Recently, we succeeded in inducing arterial, venous, and lymphatic endothelial cells (Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007 etc). All of cardiovascular cellular components, thus, could be induced in our *in vitro* differentiation system (Fig. 1). Recently, we found that an immunosuppressant, cyclosporine-A, possesses a novel effect to potentially induce cardiomyocytes and cardiac progenitors from Flk1+ mesoderm cells (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009). Using our constructive induction system for vascular cells, we demonstrated that protein kinase A (PKA) enhances vascular progenitor potential to endothelial competent through dual upregulation of VEGF receptors, Flk1 and neuropilin1, in Flk1+ cells (Yamamizu, **Blood**, 2009). Moreover, we also demonstrated that Notch and β -catenin directly interact in Flk1+ cells and determine arterial endothelial cell fate (Yamamizu, **J Cell Biol**, in press).

Recently, we have started new research with the use of novel adult tissue derived pluripotent stem cells, induced pluripotent stem (iPS) cells, and succeeded in systematic cardiovascular cell differentiation of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008). Research projects using human iPS cells for cardiovascular regeneration have been already launched.

In this system, we can manipulate the fate of cell differentiation, observe the behavior of differentiating cells, purify and obtain cells at various differentiation stages. This system provides us possibilities to dissect the mechanisms of cardiovascular development from new aspects, and offers novel potentials for cardiovascular regeneration.

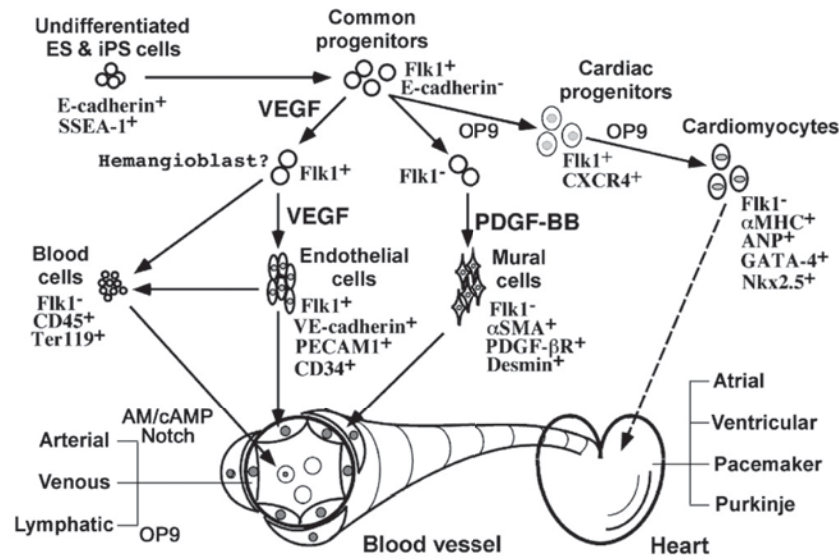


Fig. 1 : Cardiovascular development in ES cell *in vitro* differentiation system

Research Projects :

1. Elucidation of cellular and molecular mechanisms of vascular cell differentiation and specification using ES cell *in vitro* differentiation system.

- 1) Comprehensive molecular cloning of genes for endothelial cell differentiation by global gene expression profile with DNA chip
- 2) Novel *in vitro* functional assay system using vector-based siRNA expression (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006).
- 3) Specific induction of various endothelial cells types (i.e., arterial, venous, and lymphatic) and investigation of the mechanisms for endothelial specification (Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006 ; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006 ; Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007 ; Yamamizu, **J Cell Biol**, in press).
- 4) PKA in the regulation of vascular progenitor potential (Yamamizu, **Blood**, 2009)
- 5) Significance of rheological force on endothelial differentiation and diversification (Yamamoto, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2005).

2. Application of induced vascular cells to vascular regeneration

- 1) Evaluation of appropriate differentiation stage of donor cells for cell transplantation. (Yurugi-Kobayashi, **Blood**, 2003).
- 2) Improvement of the efficacy of recruitment, contribution, and survival of donor cells, by modifying gene expressions in donor cells.
- 3) Development of novel hybrid vessels with ES cells and artificial scaffolds (Huang, **J Artif Organ**, 2005).

3. Cardiomyocyte induction from ES cells

- 1) Establishment of a novel cardiomyocyte induction system in 2-dimensional culture (Yamashita, **FASEB J**,

2005).

- 2) Dissection of cellular and molecular mechanisms of cardiomyocyte differentiation
- 3) Ion channels to reconstitute automaticity of ES cell-derived cardiomyocytes (Yanagi, **Stem Cells**, 2007)
- 4) Specific and efficient expansion of cardiac progenitor cells and cardiomyocytes by cyclosporine-A (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009).
- 5) Application to cardiac regeneration – Novel cardiac progenitor therapy

4. Cardiovascular differentiation using primates ES cells

- 1) Vascular cell differentiation from monkey ES cells (Sone, **Circulation**, 2003) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine).
- 2) Vascular cell differentiation from human ES cells (Sone, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2007 ; Yamahara, **PLoS One**, 2008) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences)
- 3) Cardiomyocyte differentiation using human ES cells

Our human ES cell research project “Research for differentiation mechanisms of cardiovascular cell differentiation using human ES cells” has been approved by the Science Ministry of Japan (2005.3.10).

5. Cardiovascular differentiation and regeneration using induced pluripotent stem (iPS) cells (Collaboration with Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University).

- 1) Establishment of cardiovascular cell differentiation system of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008 ; **Best Paper Award** in Basic Science category, *Circulation* 2008).
- 2) Cardiovascular cell differentiation and regeneration from human iPS cells.
- 3) Application of iPS cell differentiation system to chemical biology and drug screening (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

(* corresponding author)

Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, Yamashita JK*. Convergence of Notch and β -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. **J Cell Biol**, in press

Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK*. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. **Blood**, 114 : 3707-3716, 2009

Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu SI, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K, Takano M. The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. **Cardiovasc Res**, 83 : 682-687, 2009

Sasaki D, Shimizu T, Masuda S, Kobayashi J, Itoga K, Tsuda Y, Yamashita JK, Yamato M, Okano T. Mass preparation of size-controlled mouse embryonic stem cell aggregates and induction of cardiac differentiation by cell

patterning method. **Biomaterials**, 30 : 4384-4389, 2009.

Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK*. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 379 : 115-120, 2009.

2) 和文総説

山下 潤. 「iPS 細胞研究の現状と展望」循環器科・特集「循環器疾患の再生医療 update」66 : 472-480, 2009. 科学評論社

山下 潤. 「iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導とその応用」臨床検査 53 : 1097-1103, 2009. 医学書院

山下 潤. 「iPS 細胞研究の現状と展望」分子血管病・特集「幹細胞研究の新展開」10 : 18-26, 2009. 先端医学社

山下 潤. 「ES 細胞および iPS 細胞からの血管細胞分化」再生医療 8 : 28-33, 2009. 日本再生医療学会雑誌

山下 潤. 「ES 細胞, iPS 細胞を用いた血管再生医療技術」幹細胞の分化誘導と応用－ES 細胞・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線－. 第 3 章 p253-261, 2009. NTS.

山下 潤. 「iPS 細胞と心血管再生」Annual Review 循環器 2009. p1-p9, 2009. 中外医学社

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Uosaki H, Yan P, Yamashita JK. Cyclosporin-A efficiently induces cardiogenic progenitors and cardiomyocytes from embryonic and induced pluripotent stem cells. , 第 6 回心血管幹細胞研究会, 2009.1.16-17, 東京
魚崎英毅, 顔 培実, 山下 潤, サイクロスポリン A を用いた ES 細胞及び iPS 細胞からの心筋及び心筋前駆細胞の効率的誘導法の確立, 第 8 回再生医療学会総会, 2009.3.5-6, 東京

Uosaki H, Yan P, Yamashita JK. Efficient induction of cardiogenic progenitors and cardiomyocytes from Embryonic and induced pluripotent stem cells., Keystone symposia (poster), 2009.3.15-20, USA

Yamamizu K, Yamashita JK. Converged signaling of Notch and beta-catenin in differentiating vascular progenitors determines arterial identity. – Identification of a novel arterial-specific protein complex –, 第 73 回日本循環器学会. 2009. 3. 20-22. 大阪

Yamamizu K, Yamashita JK. Converged signaling of Notch and beta-catenin in VEGFR2+ vascular progenitor cells confers arterial-venous specification, 7th Stem Cell Research Symposium, 2009. 5. 15-16. 東京

Uosaki H, Yan P, Yamashita JK. DIFFERENTIATION STAGE-SPECIFIC EFFECT OF CYCLOSPORINE A ON MESODERM POTENTLY INDUCES CARDIAC PROGENITORS AND CARDIOMYOCYTES FROM EMBRYONIC STEM CELLS., International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 7th annual meeting (poster), 2009.7.8-11, Barcelona, Spain

Narazaki G, Yamashita JK. Differentiation properties of various mouse induced pluripotent stem cell lines into cardiovascular lineages. ISSCR 7th Annual Meeting (poster), 2009. 6. 8-11. Barcelona, Spain

Yamamizu K, Kawasaki K, Watabe T, Yamashita JK. Protein kinase A enhances differentiation potentials of vascular progenitors through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. ISSCR 7th annual meeting (poster), 2009.7.8-11, Barcelona, Spain

- Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Uosaki H, Narazaki G, Matsuda H, Matsuoka S, Takahashi K, Nakao K, Nakatsuji N, Yamanaka S, Yamashita JK. Induction of functional cardiomyocytes from mouse and human induced pluripotent stem cells. ISSCR 7th annual meeting (poster), 2009.7.8-11, Barcelona, Spain
- 魚崎英毅. ES細胞からの心筋分化と増殖に関する研究, 京都大学大学院教育コース「再生医療・臓器再建」優秀賞, 2009.8.1-2, 滋賀
- Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK. Enhancement of vascular progenitor potential by Protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. 2009 特定領域「がん」合同若手ワークショップ. 2009.9.1. 長野
- Yamamizu K, Kawasaki K, Watabe T, Yamashita JK. PKA promotes endothelial cells differentiation via expression of Flk-1 and Neuropilin-1. 第17回日本血管生物医学会. 2009.10.8-9. 東京
- Uosaki H, Yamashita JK. Embryonic stem cell-derived cardiomyocyte, differentiation and proliferation., Kyoto university Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium / Retreat 2009, 2009.11.6-8, 兵庫
- 嵯崎元太, 山下 潤. 人工多能性幹(iPS)細胞からの心血管細胞分化誘導と応用. 第19回日本循環薬理学会. 2009.11.27. 京都
- Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK. Protein kinase A enhances endothelial cell differentiation potential in vascular progenitors. 2009 年京都大学再生医科学研究所学術講演会. 2009.12.14. 京都

2) 講演・シンポジウム

- 山下 潤. iPS細胞からの心血管系への分化誘導. 第2回 iPS細胞研究産業応用懇話会. 2009.2.2. 京都
- 山下 潤. ES細胞及び iPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 平成20年度歯科学術講演会. 2009.2.23. 京都
- 山下 潤. ES細胞・iPS細胞からの心筋分化研究. 第8回日本再生医療学会総会シンポジウム「ES細胞研究の現状と課題」(招請講演). 2009.3.5-6. 東京
- Yamashita JK. Research for cardiovascular development and regeneration with ES and iPS cells. Waseda-NUS Joint symposium, "Chemical EPIgenomics"- The fusion of epigenomics, stem cell biology and chemical biology (invited). 2009.3.11-13. Singapore.
- 山下 潤. Perspectives of induced pluripotent stem cells in regenerative medicine. 第73回日本循環器学会トピック「再生医療2009」(招請講演). 2009.3.20-22. 大阪
- Yamashita JK. Cardiac Progenitors and Cardiomyocytes from Induced Pluripotent Stem Cells. 第73回日本循環器学会プレナリーセッション"Frontiers in Regeneration with Pluripotent Cells"(招請講演). 2009.3.20-22. 大阪
- 山下 潤. ES細胞及び iPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 日本産業皮膚衛生協会会員研修会. 2009.3.24. 京都
- 山下 潤. ES細胞及び iPS細胞を用いた血管分化・多様化・再生機構の解析. 日本内分泌学会シンポジウム「血管新生と心血管系内分泌の新展開」(招請講演). 2009.4.23-25. 前橋
- 山下 潤. ES細胞および iPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 次世代創薬研究所セミナー. 2009.4.24. 高崎
- 山下 潤. ES細胞および iPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 高瀬川カンファレンス. 2009.5.19. 京都
- 山下 潤. ES細胞および iPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 第11回循環器再生医療研究会(特別講演). 2009.5.23. 東京

- Yamashita JK. Cardiovascular cell differentiation from ES and iPS cells. EMBO Workshop, Lymphatic and Blood Vasculature : from models to human disease(invited). 2009. 6. 4-5. Helsinki, Finland.
- 山下 潤. 再生医療の新展開－ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究－. 第19回臨床検査専門医会春季大会(特別講演). 2009. 6. 13. 富山
- 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 第12回小児心血管分子医学研究会(特別講演). 2009. 7. 15. 神戸
- 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 第2回Vascular Medicine研究会. 2009. 7. 24. 東京
- Narazaki G, Yamashita JK. Cardiovascular cell differentiation from ES and iPS cells. FASEB Summer Research Conference 2009(invited). 2009. 8. 2-7. Lucca, Italy
- Yamashita JK. Vascular cell differentiation & diversification from ES and iPS cells. The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology(invited). 2009. 8. 20-21. Seoul, Korea
- Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK. Augmentation of vascular progenitor potential by Protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1; Presentation of Young Investigator Award, The 7th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, 2009. 8. 20-21. Seoul, Korea
- 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 日本薬学会「生体機能と創薬シンポジウム 2009」(招請講演)2009. 8. 26-27. 東京
- Yamashita JK. iPS cells for cardiovascular research. JSPS presents, Sweden – Japan Joint Colloquium, “Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology”(invited). 2009. 9. 5. Stockholm, Sweden
- 山下 潤. iPS細胞からの系統的血管細胞誘導システム. 独立行政法人医薬基盤研究所「基盤研セミナー」. 2009. 9. 29. 大阪
- 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 第14回静岡健康・長寿学術フォーラム(招請講演). 2009. 10. 3. 静岡
- Yamashita JK. Cardiovascular cell differentiation and diversification from ES and iPS cells. KSMBMB 2009 Annual International Conference, Symposium “Cardiogenesis, Angiogenesis, and Lymphangiogenesis”(invited). 2009. 10. 29-30. Seoul, Korea.
- 山下 潤. iPS細胞による心臓再生. 第13回日本心不全学会学術集会シンポジウム「心臓の再生医学の現状と展望」(招請講演). 2009. 11. 1. 福岡
- Narazaki G. Directed and Systematic Differentiation of Cardiovascular Cells from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells, American Heart Association Scientific Session 2009, Groundbreaking Studies in the Practice of Cardiovascular Medicine : Circulation Editors' Choices(invited). 2009. 11. 14-19, Orlando, USA
- 山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 再生医療サポートプラットフォーム「再生医療の全体像を見わたせるわかりやすい解説講座」. 2009. 11. 30. 京都
- 山下 潤. 血管多様性が生み出す生体機能と疾患 Vasculodiversity in health and disease. 2009年日本分子生物学会ワークショップ(オーガナイザー). 2009. 12. 12. 横浜
- 山水康平, 山下 潤. Differentiation and diversification of vascular endothelial cells in ES cell differentiation system. 2009年日本分子生物学会ワークショップ(招請講演). 2009. 12. 12. 横浜



幹細胞加工研究領域 Laboratory of Stem Cell Engineering

分野主任 准教授 多田 高
Assoc. Prof. Takashi Tada

【研究概要】

背景)

受精から始まる個体発生は、たった一個の細胞の細胞分裂による数十兆個への増殖と共に、巧妙に制御された細胞分化によってもたらされる。この過程で、受精卵は、体を形つくる全ての種類の細胞に分化可能な多能性(万能性)が失われ、限られた役割を果たすべく特殊化した細胞へと分化そして老化してゆく。一般に、分化は後戻りのできないプロセスとの概念が固定されていた。我々は、多能性幹細胞(pluripotent stem cell)の一種である胚性幹(ES)細胞と体細胞を細胞融合すると、体細胞核ゲノムのエピジェネティクスが書き換えられ未分化細胞様に再プログラム化されることを世界に先駆けて発見した(Tada et al.(2001)Curr. Biol.)。この結果は、分化細胞を直接培養条件下で多能性幹細胞に再プログラム化可能であること、またES細胞には体細胞の再プログラム化に必要な因子があることを示していた。現在では、ES細胞から同定された因子(Oct4, Sox2, Klf4 & c-Myc)の強制発現により体細胞が多能性幹細胞(人工多能性幹(iPS; induced pluripotent stem)細胞)に再プログラム化されることが明らかになっている(Takahashi & Yamanaka (2006)Cell)。多能性幹細胞の未分化性維持に Oct4, Sox2, Nanog が中心的な役割を果たす転写因子として注目されている。

目的)

- 1) 体細胞が多能性幹細胞に再プログラム化されるメカニズム
- 2) 再プログラム化に関わる因子の働き
- 3) 再プログラム化の医学応用技術の開発

重要性)

再プログラム化による個人体細胞からの多能性幹細胞の作製成功は、拒絶反応を伴わない移植分化細胞の医療応用の扉を開き、再生医療の現実性を高める大きな一歩である。医療応用に向けて、解決しなければならない問題に焦点を絞り、一步一步クリアすることで基礎研究の社会への貢献が実現できると信じている。

再プログラム化における転写因子の働きは、その重要性を再認識させるのに充分である。再プログラム化メカニズムは、生命を次世代につなぐ仕組みを解き明かすための鍵と考えている。

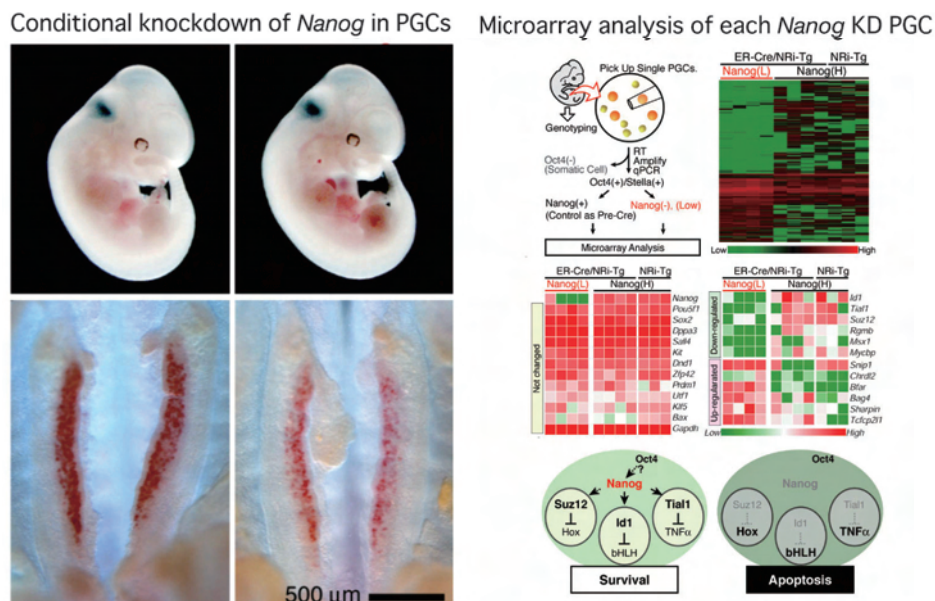


図 1. 生殖細胞での *Nanog* ノックダウンによる生殖細胞の減少と分子ネットワークの崩壊

Background)

Our body is built by an incredible variety of cell and tissue types, which develop from a single fertilized egg through embryogenesis. Determination of the cell fate is epigenetically regulated through activation or repression of specific genes. Nuclear reprogramming is a phenomenon that a specialized somatic cell acquires pluripotential competence, which is defined by multi-lineage differentiation, due to reset of epigenetic memory of the somatic cell. We found that embryonic stem (ES) cells, which have the robust capability of self-renewal with pluripotency under culture conditions, retain the nuclear reprogramming activity as shown by cell fusion with a somatic cell (Tada et al. (2001) Curr. Biol.). These findings have indicated the reality of direct reprogramming of somatic cell under a culture condition with factors isolated from ES cells. Tremendously, it has been discovered that defined factors Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc highly expressed in ES cells are sufficient for triggering nuclear reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem (iPS) cells (Takahashi and Yamanaka (2006) Cell). It has been shown that Oct4, Sox2 and *Nanog* cooperatively function as key transcription regulators in the repression of somatic cell genes and the activation of stem cell genes in pluripotent stem cells.

Reprogrammed somatic genome through cell fusion with ES cells function in cell differentiation similar to the ES genome. Comparative analyses of epigenetic modifications of the somatic genome before and after cell fusion with ES cells demonstrated that the nuclear reprogramming is induced at least through two steps ; a) erasure of the somatic cell memory accompanied with global chromatin de-condensation and b) acquirement of the pluripotent stem cell memory. However, the pathway from somatic cell to pluripotent stem cell is largely in the black box.

Aims)

- 1) Understanding of molecular mechanisms involved in nuclear reprogramming of somatic cells
- 2) Understanding of molecular function of stem cell factors in maintaining pluripotency and self-renewal
- 3) Development of nuclear reprogramming technologies toward clinical applications

Importance)

The reality of personal iPS cells from individual somatic cells through nuclear reprogramming rises the great hopes on regenerative medicine in near future. Toward realizing the regenerative medicine, further study will be required to overcome several ethical and practical obstacles.

Understanding of the molecular mechanisms of nuclear reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells will shed light on the central dogma, the succession of life.

Efficient derivation of iPS cells from the extraembryonic amnion cells

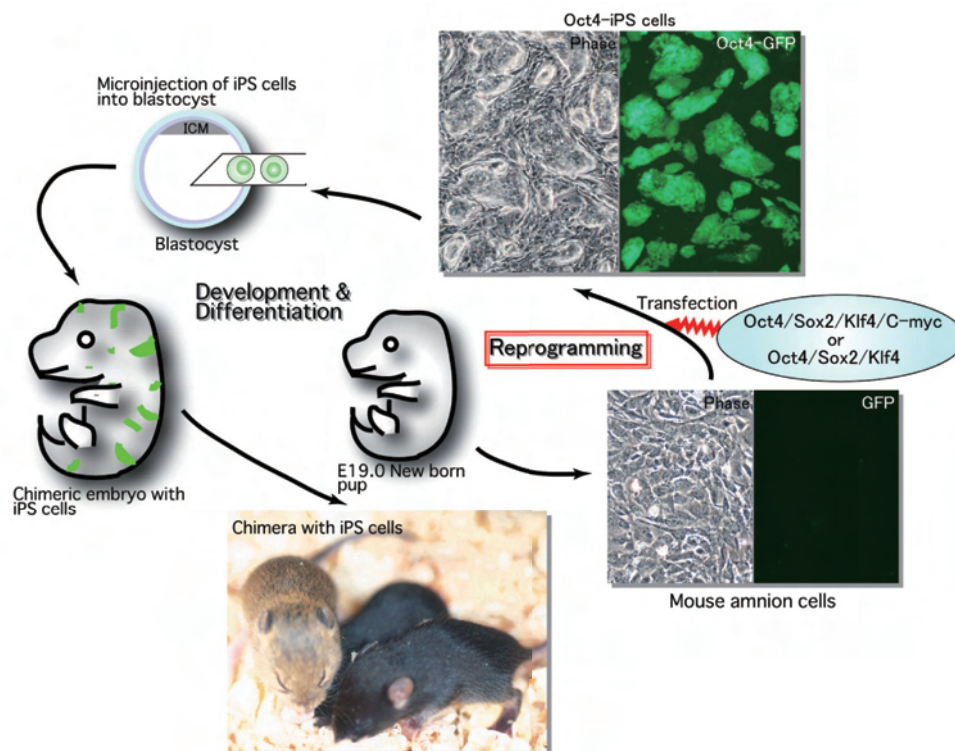


図2. 新生児胚体外組織，尿膜細胞からの効率的な iPS 細胞の作製

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Yamaguchi, S., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Sasaki, H., Nakatsuji, N., Saitou, M. and Tada, T.: Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development* **136**, pp4011-4020 (2009)
- Nagata, S., Toyoda, M., Yamaguchi, S., Hirano, K., Makino, H., Nishino, K., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Nakagawa, M., Yamanaka, S., Akutsu, H., Umezawa, A. and Tada, T.: Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells* **14**, pp 1395-1404 (2009)
- Tada, M., Matsumura, H., Kurose, Y., Nakatsuji, N. and Tada, T.: Target chromosomes of inducible deletion by a Cre/inverted loxP system in mouse embryonic stem cells. *Chromosome Research* **17**, pp443-450 (2009)

2) 著 書

- 多田 高：リプログラミングの未来と過去，「幹細胞研究の最近の進歩」(須田年生監修)pp568-580(最新医学社 増刊号 64 巻 802 号，最新医学社，2009)
- 多田 高：細胞融合と「核のリプログラミング」，「細胞核の初期化メカニズム 多能性・全能性獲得のナゾに迫る」 pp28-33(メディカルバイオ 6 巻 5 号，オーム社，2009)
- 多田 高：幹細胞と細胞核構造，「細胞核－遺伝情報制御と疾患」(平岡 泰・原田昌彦・木村宏・田代聡編集)pp 2847-2852(実験医学 増刊号 27 巻 17 号，羊土社，2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 長田翔伍，山口新平，平野邦生，多田 高：Efficient reprogramming of primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells：「第 32 回日本分子生物学会年会」(2009.12.9-12，横浜)
- 標葉隆馬，川上雅弘，川上浩司，永田素彦，多田 高，加藤和人：iPS 細胞・再生医療研究に関する意識調査：「第 32 回日本分子生物学会年会」(2009.12.9-12，横浜)
- 山口新平，栗本一基，藪田幸宏，佐々木裕之，中辻憲夫，斉藤通紀，多田 高：マウス生殖細胞における *Nanog* 遺伝子のリプログラミング機能：「公開シンポジウム：第 2 回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」(2009.11.26-27，東京)
- 長田翔伍：ヒトおよびマウス胚体外組織細胞からの iPS 細胞誘導：「生殖サイクル若手研究会」(2009.8-27-29，御殿場)
- Yamaguchi, S., Sasaki, H., Nakatsuji, N., Tada, T.: Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells:「Conference: Regulatory Networks in Stem Cells」(2009.2.11-13, Singapore, SINGAPORE)
- Nagata, S., Yamaguchi, S., Hirano, K., Tada, T.: Efficient generation of induced pluripotent stem cells from extraembryonic tissue:「Conference: Regulatory Networks in Stem Cells」(2009.2.11-13, Singapore, SINGAPORE)

2) 講演・シンポジウム

- 多田 高：ES 細胞および iPS 細胞を利用した薬理・トキコロジー研究とその将来：「第 36 回日本トキコロジー学会学術年会，特別講演」(2009.7.6-8，盛岡) (招待講演)
- Tada, T.: Genetic modification-free reprogramming to induced pluripotent stem cells: Fantasy or Reality? :「Bio-Medical Asia 2009」(2009.3.16-19, Singapore, SINGAPORE) (invited)
- Tada, T.: Nuclear Reprogramming in vitro and in vivo:「Seminar in the Max Planck Institute for Molecular Biomedicine」(2009.2.6, Munster, GERMANY) (invited)
- Tada, T.: Nuclear Reprogramming and Regenerative Medicine:「INDO-JAPAN Workshop on Nanobiotechnology and Nanodevices」(2009.1.23-24, Thanjavur, INDIA) (invited)

細胞プロセッシング研究領域 Laboratory of Cell Processing

客員教授 高橋 恒夫

Visiting Prof. Tsuneo A Takahashi

客員准教授 楠田(古江) 美保

Visiting Assoc. Prof. Miho Furue Kusuda

【研究概要】

細胞プロセッシング研究領域は、ヒト ES 細胞の臨床応用を目指しその基盤技術の研究開発を行うべく、設置された部門である。ES 棟地下に細胞処理施設(CPC : Cell Processing Center)を設置し、その管理を行うとともに、臨床応用可能な医薬品 GMP に準拠したヒト ES 細胞リソースの供給を目指し、その基盤技術の研究開発を行っている。CPC は空調管理、清浄度管理、及び作業管理を含む、医薬品 GMP ハードに準拠した施設としている。また CPC には、細胞調製室、閉鎖系として独立して細胞調製、培養が可能な Cell-processing Isolator システム、細胞保存室がある。

2008 年度は、昨年 CPC のヒト ES 細胞株の樹立研究施設としての政府による確認が行われたのに伴い、ヒト ES 細胞の樹立研究、培養試験を実施している。現時点では、霊長類胚性幹細胞研究領域により樹立されたヒト ES 細胞株を、在来の培養手法を用いて培養試験を行っているが、順次、臨床レベルで使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる取扱基準規格を構築すると共に、臨床応用に使用可能なレベルのヒト ES 細胞株の樹立と、将来のヒト ES 細胞バンク構築の可能性の探索を行う。

また、臨床応用に必要となる要件として、動物由来成分を用いない完全合成培地による培養の検討、ヒト由来フィーダー細胞の試験を行っている。これら試験の評価に必要な基準は、国際的に通用するレベルを目指している。この為我々は、ISCBI(International Stem Cell Banking Initiative)による ES 細胞バンキングの国際基準策定会議に参画し、既に研究レベルでのヒト ES 細胞バンキングに関する品質基準が発行されている。現在、臨床レベルでのヒト ES 細胞バンキングの品質基準の策定に参画している。

この他、ヒト ES 細胞株のより適切な品質管理体系の確立の為に、その凍結保存過程に着目し、温度制御ステージつき顕微鏡を用いたヒト ES 細胞コロニーの凍結解凍過程の解析、及び DSC(示差走査熱量計)を用いた熱力学的解析を通じた、細胞、コロニーレベルでの凍結解凍現象の理論化、凍結解凍条件の最適化の検討を試みている。

The Laboratory of Cell Processing was established to develop basic technologies to produce and supply human embryonic stem cells (hES cells) with clinical grade. The cell processing center (CPC), located at underground level of the ES building in the Institute, was built to establish hES cells for clinical use satisfying the standards of Pharmaceutical Good Manufacturing Practices (GMP) and the research necessary to achieve that. The CPC meets the hardware standard of GMP such as management of work, air conditioning, clean level of air, etc. The CPC is composed of several rooms, one for cell processing, one for the Cell-Processing Isolator in which cells can be processed and cultured in a complete closed system, cell-storage, computer controlled observation room, cell

storage, supply room etc.

Following the approval of the Government (MEXT) that the CPC can be used as a facility to establish hES cells, we have started research on the establishment and culture of hES in this facility.

The trial to establish clinical-grade hES cells has been done using the conditions developed to establish monkey ES cells, but it should be developed to make the hES cells possible for clinical use and to establish of hES cell banking system.

For the clinical application of hES cells, there are several issues remain to be solved, such as developing an effective complete defined culture medium without animal serum and/or human-tissue derived feeder cells. To verify these factors we should develop a standard that meets the international level. For this we have joined the Working Group for International Standards for ES cells and their banking organized by the ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative). Recently the ISCBI established “Consensus Guidance for Bankig and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes” as a first stage, and now working on that for Clinical Purposes.

One important aspects of our research is to develop an effective protocol for cryopreservation of hES cells that should significantly increase the recoveries of the cells that is quite low at present. In this study we utilize a cryo-microscope equipped with a temperature-controlling stage to observe the cells under freezing and thawing, and a differential scanning calorimeter to measure heat transfer in the cell and suspension medium during the process. First, we have refined our methods with single hES cells and then colonies, and the techniques will be refined and validated on hES cells. We expect this strategy will allow us to find an optimal cryopreservation protocol for hES cells that will contribute to make these cells suitable for clinical use.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Yohei Hayashi, Miho Kusuda Furue, Satoshi Tanaka, Michiko Hirose, Hiroki Danno, Kiyoshi Ohnuma, Shiho Oeda, Yuko Aihara, Kunio Shiota, Atsuo Ogura, Shoichi Ishiura, and Makoto Asashima BMP4 Induces Trophoblast from Mouse Embryonic Stem Cells through the activation of Cdx2 expression. In Vitro Cellular & Devopmental Biology Animal. 1071-2690(print)1543-706X(Online)

2) 和文総説

古江-楠田美保：第5章細胞周辺環境のための培養技術1 培養液，330-333「ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術」－細胞の生存，増殖，機能のコントロールから創薬研究，再生医療まで－ 遺伝子医学 MOOK 別冊 p330-333 メディカル ドゥ 2009

高田 圭，末盛博文：医療応用に適した ES 細胞培養システム，実験医学増刊「再生医療の最前線～幹細胞の増殖維持・分化制御・品質管理の基盤技術確立と制度整備」，羊土社(2010 in Press)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Integrins expression profile in human ES and iPS cells in the defined culture conditions Daiki Tateyama, Naohiro Kimura, Midori Hayashida, Yutaka Ozawa, Hiroko Matsumura, Arihiro Kohara, Tetsuji Okamoto, Akihiro Umesawa, and Miho Kusuda Furue, 第7回 ISSCR スペイン バルセロナ

LAMININ PROMOTES HUMAN EMBRYONIC STEM CELL DIFFERENTIATION INTO MESODENDODERM Inamura, Mitsuru, Kawabata, Kenji, Sakurai, Fuminori, Katayama, Kazufumi, Hayashida, Midori, Matsumura, Hiroko, Furue, Miho Kusuda, Mizuguchi, Hiroyuki, 第7回 ISSCR スペイン バルセロナ

ヒト ES, iPS 細胞における創薬応用のための標準化 古江-楠田 美保, 第22回日本動物実験代替法学会総会 大阪 11月

創薬応用のためのヒト ES, iPS 細胞の標準化 古江-楠田 美保, 日本組織培養学会第82回大会 シンポジウム (Ⅲ) 創薬 茨木 5月

ヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞の細胞表面抗原発現による標準化 Standardization of human ES and iPS cells by analyzing cell surface antigens 古江-楠田 美保, 第32回日本分子生物学会 ワークショップ 幹細胞と糖鎖 12月 横浜

一般口演

無血清培養下におけるヒト胚性幹細胞ならびに人工多能性幹細胞のインテグリン発現プロファイル 館山大揮, 木村直大, 林田みどり, 小澤 裕, 松村紘子, 小原有弘, Paul J Gokhale, 岡本哲治, 梅澤明弘, Peter W. Andrews, 古江-楠田 美保, 日本組織培養学会第82回大会 一般口演 茨木 5月

未分化ヒト ES 細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果 Laminin promotes human embryonic stem cell differentiation into mesodendoderm, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Kazufumi Katayama, Midori Hayashida, Hiroko Matsumura, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi, 日本組織培養学会第82回大会 一般口演 茨木 5月

マウス ES 細胞から誘導された神経堤細胞の特性解析 Characterisation of induced neural-crest cells from mouse ES cells. 相原祐子, 林 洋平², 有本信貴, 大沼 清, 中西未央, 藁科雅岐, 内山英穂, 浅島 誠, 古江-楠田美保, 日本組織培養学会第82回大会 一般口演 茨木 5月

Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human induced pluripotent stem cells. Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura, Norihisa Furukawa, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi, 第32回日本分子生物学会 一般口演 12月 横浜

ヒト ES 細胞や iPS 細胞からの内胚葉系細胞および肝細胞への分化誘導法の開発 稲村 充, 川端健二, 形山和史, 梅澤明弘, 阿久津英憲, 林田みどり, 松村紘子, 古江-楠田美保, 水口裕之, 第16回肝細胞研究会 6月 山形

2) 講演会, シンポジウム

未分化ヒト ES 細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果 稲村 充, 川端健二, 形山和史, 林田みどり, 松村紘子, 古江-楠田美保, 水口裕之, フォーマ・バイオフィォーラム 2009

ヒト ES 細胞のバンキングに向けた CPC の構築と課題 高田 圭, 第 7 回 CPC セミナー (2009.2.12)

再プログラム化研究領域

Laboratory of Reprogramming Research

客員教授 鳥居 隆三

Visiting Prof. Ryuzo Torii

サル体細胞核移植クローン胚の作製

Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkey

【研究概要】

過去 3 年間にわたり実施してきた体細胞核移植によるテラーメード ES 細胞作製の試みは、継代出来る ES 細胞株の樹立には至らなかった。本年度はさらに核移植後の再構築胚の発生改善を目的としてトリコスタチン A (TSA) の添加を試みた。また、再構築胚の初期における染色体分配が正常に行われているか否かを確認する方法として、ライブセルイメージング法を試みた。その結果、TSA は今回用いた濃度条件では発生改善に効果がみられなかった。また再構築胚の初期の 2 細胞期胚のライブセルイメージングにおいては染色体分配異常が多く見られた。一方、正常な染色体分配が見られた胚においては胚盤胞期胚まで発生し、内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) を取り出し ES 細胞樹立を試みることが出来た。しかし、継代 3 代目において接着できず樹立には至らなかった。

以上の成績から、カニクイザルにおいては体細胞核移植法によるテラーメード ES 細胞樹立法は胚の滅失の問題に加え胚盤胞期胚作製の効率が極めて悪く、残念ながら ES 細胞樹立は極めて困難であるとの結論に至った。他方、カニクイザルからの iPS 細胞は比較的容易に樹立できたことから、臨床応用研究にはむしろ iPS 細胞が有用であると考えられる。

1. トリコスタチン A 添加によるカニクイザルの体細胞核移植胚の発生改善の検討

未受精卵子の核を取り除いた後にドナーとなる体細胞 (胎子線維芽細胞) を注入する核移植法によって再構築胚を

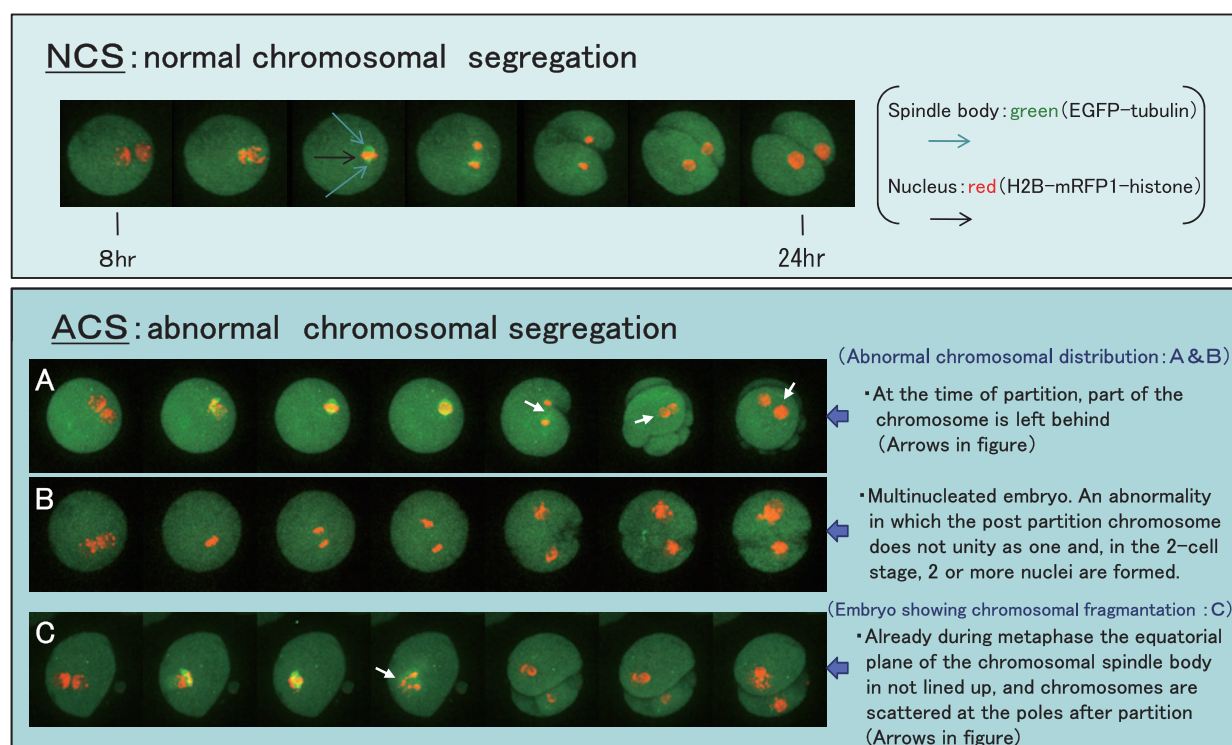
Table 1 Effect of Trichostatin A (TSA) in development of nuclear transferred embryo in cynomolgus monkey

No. of oocyte	No. of enucleation / injection	No. of activation (IM+DMAP)	No. of treatment with TSA		No. (%) of 2-cell	No. (%) of 4-cell	No. (%) of 8-cell	No. (%) of morula	No. (%) of blastocyst
28	22/22	22	0nM	12	6 (50)	5 (42)	3 (25)	0 (0)	0 (0)
			5nM	11	6 (55)	6 (55)	6 (55)	0 (0)	0 (0)

作製した後、培養液中にマウスやウシの核移植後の胚の発生改善に用いられているヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A (trichostatin A: TSA) を 5nM 添加した。その結果、Table1 に示したように、核移植後の再構築胚への発生に今回用いた濃度の TSA 添加は何ら効果がみられず、発生改善効果は得られなかった。

2. 蛍光ライブセルイメージングによる体細胞核移植胚の染色体分配の観察

体細胞核移植による再構築胚は、受精胚の発生過程と同様に核の脱凝集や再凝集といった染色体構造レベルにおいて大きな変化が見られ、さらに染色体の分配においてクロマチンや核の構造レベルの変化が見られる。今回は再構築胚において、この染色体分配が正常に行われているか否か確認するために初期胚のライブセルイメージング法



(Joint research with Dr. Kazuo Yamagata and Dr. Teruhiko Wakayama)

Fig. 1 Development of embryos by intra cytoplasmic sperm injection after mRNA injection by live-cell imaging

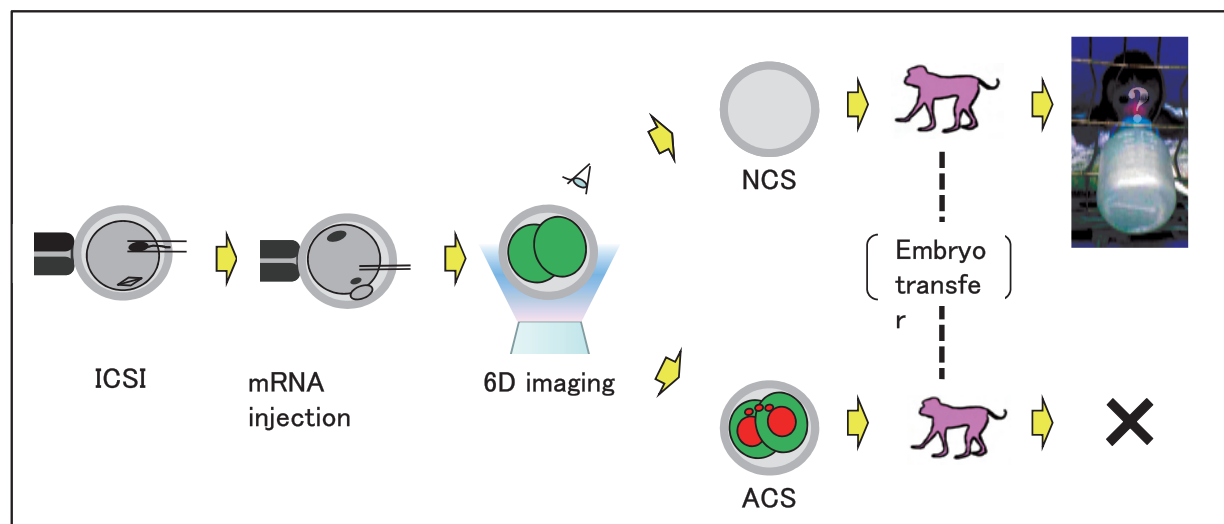


Fig. 2 Birth after embryo transfer of NCS or ACS embryo detected by live-cell imaging

を理研(RIKEN)山縣先生のご協力を得て、方法の開発とそれを用いて実際の再構築胚で確認を試みた。

ライブセルイメージング法を確立するために、まず顕微授精(intra cytoplasmic sperm injection)胚における染色体分配を確認した。その結果、染色体分配が正常に行われた NCS(normal chromosome segregation)授精胚では、その後の胚移植により産子を得ることが出来たが、異常が見られる ACS(Abnormal chromosome segregation)授精胚は、途中発生が停止あるいは胚盤胞期胚に進んでも胚移植後、着床、妊娠は成立しないことを確認した(Fig. 1 & 2)。

次に、体細胞核移植胚において同様にライブセルイメージングを試みた結果、Table 2に示したように、成熟個体の皮膚細胞から得た線維芽細胞では8細胞期胚で停止したが、胎子線維芽細胞では1例ではあったが、NCSにおいて順調に発生し胚盤胞期胚から内部細胞塊(inner cell mass)を分離することが出来、ES細胞を継代するまでに至った。しかし、3代目に至る継代において接着が不十分でES細胞樹立には至らなかった(Fig. 3 & 4)。

今回はライブセルイメージングを行うための方法の確立と、顕微授精胚における NCS と ACS に産子獲得という大きな差が生じることを確認したことから、このライブセルイメージングは再構築胚の初期のスクリーニング法として有用であることが考えられ、今後さらに例数を増やして確認を進めたい。

Table 2 Development of nuclear transferred embryos after mRNA injection

Donor cell	No. of oocyte	No. of enucleation/injection	No. of activation (IM+DMAP)	No. of mRNA injection		No. (%) of 2-cell	No. of NCS or ACS		No. (%) of 4-cell	No. (%) of 8-cell	No. (%) of morula	No. (%) of blastocyst	ES established
adult fibroblast (Passage : 0 to 1st)	106	89/80	78	-	7	4 (57)	-		4	4	2	0	-
				injection	63	18(29)	NCS	7	5	0	0	0	-
							ACS	11	6	3	0	0	-
fetus fibroblast (Passage :5th)	20	16/13	13	-	7	2(29)	-		2	2	0	0	-
				injection	4	1(25)	NCS	1	1	1	1	1	± (CE0955F)
							ACS	0	0	0	0	0	-

NCS:normal chromosome segregation
 ACS:abnormal chromosome segregation
 IM:ionomycin
 DMAP:6-dimethylaminopurine

(NCS)



(ACS)

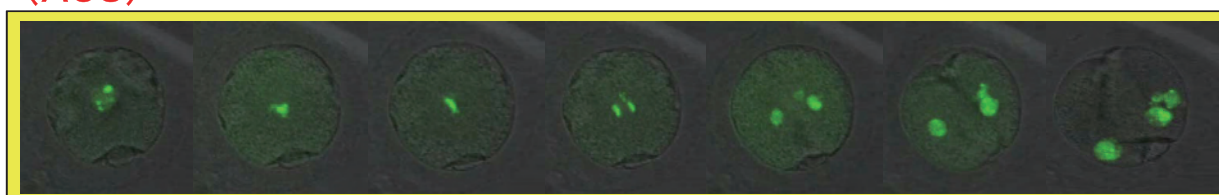


Fig. 3 Development of nuclear transferred embryos after mRNA injection by live-cell imaging

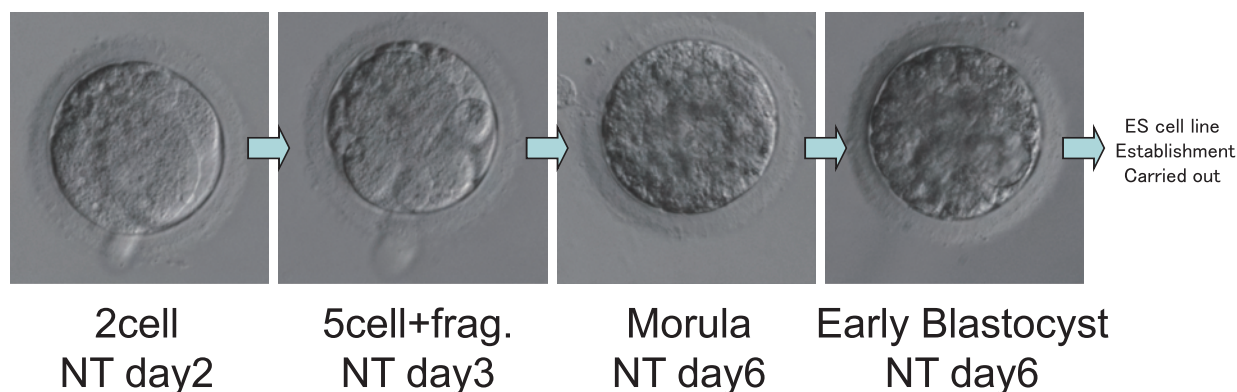


Fig. 4 Establishment of ES cells from nuclear transferred NCS embryos (CE0955F) in cynomolgus monkey

Research abstract :

We did not succeed in obtaining ES cell lines that are capable of passage in our attempt to create tailor-made ES cells in the somatic cell nuclear transfer that we have been doing for the past three years. This year we attempted to improve the development of reconstructed embryos subsequent to nuclear transfer by adding Trichostatin A (TSA). Additionally, we attempted to confirm whether or not chromosomal segregation was being carried out normally during the initial stages of embryonic reconstruction using live-cell imaging. The results were that the TSA concentration conditions used this time were not effective in improving development. Additionally, there was much abnormal chromosomal segregation observed during the live-cell imaging of the 2-cell embryo in the initial stages of embryonic reconstruction. On the other hand, embryos in which normal chromosomal segregation was observed developed to the blastocyst stage, and it was possible to remove inner cell mass (ICM) and attempt to establish ES cell lines. However, we were unable to reach the 3rd generation of passage and unable to achieve establishment.

From the above results, for the tailor-made ES cell establishment method using the somatic cell nuclear transfer method in the cynomolgus monkey, in addition to problem of embryo loss, the efficiency for creating blastocyst-stage embryos was extremely poor, and we reached the determination that regrettably ES cell establishment was extremely difficult. On the other hand, it was relatively easy to establish cynomolgus monkey iPS cells, and it goes without saying that iPS cells are expected to be useful in clinical application research.

1. Study on the improvement of embryonic generation by somatic cell nuclear transfer in the cynomolgus monkey with addition of Trichostatin A

After the constructed embryos were created using the nuclear transfer method, in which donor cells (fetus fibroblast) are injected into denuded mature oocytes, 5nM of Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor used to improve the development of murine and bovine embryos after transfer, was added to the incubation medium. The results, as shown in Table 1, were that no effect was seen in terms of development of reconstructed embryos from nuclear transfer with the concentration of TSA that was used this time, and no effect in regard to improved development was obtained.

2. Observation of chromosomal segregation in somatic cell nuclear transferred embryos using fluorescent live-cell imaging

As for reconstructed somatic cell nuclear transferred embryos, large changes were seen at chromosomal construction levels, such as disaggregation or recondensation of the nucleus in the same manner as occurs in the development process in fertilized embryos; furthermore, changes were seen at the chromatin or the nuclear construction level in chromosomal segregation. This time, in the embryonic construction, we obtained the cooperation of Dr. Yamagata (RIKEN CDB) for live-cell imaging in the initial embryonic stage in order to determine whether this chromosomal segregation was carried out normally or not, and we attempted to develop this method and use it in actual confirmation of embryonic reconstruction.

In order to establish the live-cell imaging method, we first confirmed chromosomal segregation in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryos. As the results of this, we found that offspring were obtainable from embryo transfers done after normal chromosomal segregation (NCS) was carried out in fertilized embryos, but we confirmed that in cases where abnormality was seen (abnormal chromosomal segregation, or ACS) the development of the fertilized embryo was arrested in midstream or, even if it did progress to the blastocyst stage, after embryo transfer it failed to implantation and pregnancy failed (Fig.1)

Subsequently, in the somatic cell nuclear transferred embryos the same manner of live-cell imaging was attempted, and, as the results show in Table 2, in the fibroblast obtained from the skin cells of mature individuals, development stopped at the 8-cell stage embryo, but, in 1 fetus fibroblast case, it was possible with NCS to develop smoothly and separate the ICM from the blastocyst, and we obtained passage of the ES cells. However, adhesion was insufficient when obtaining passage number 3, and we failed to establish the ES cells (Fig. 2).

This time, since we established the methodology necessary for carrying out live-cell imaging and confirmed the large gap in the acquisition of offspring which occurs with NCS and ACS in ICSI, we believe that this live-cell imaging will be useful for screening during the initial stages of embryonic reconstruction, and in the future we hope to increase our experience and further develop our confirmation ability.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

Yamasaki J, Okahara-Narita J, Iwatani C, Tsuchiya H, Torii R, Successful delivery after vitrification of cynomolgus monkey embryos using the CryotomTM, , Exp Anim, 58(3), S101, 2009.

Iwatani C, Yamasaki J, Okahara-Narita J, Tsuchiya H, Torii R, Follicular stimulation with micro infusion pump in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis), Exp Anim, 58(3), S108, 2009.

◆ 学会等の発表 ◆

学会・研究会発表

岡原純子, 森絵里子, 梅田理恵子, 野瀬俊明, 鳥居隆三(2009)カニクイザル iPS 細胞の作製, 日本生殖再生医学会,

第4回学術集会, 東京(3/19/09).

岩谷千鶴, 山崎樹里, 岡原(成田)純子, 土屋英明, 鳥居隆三(2009)マイクロインフュージョンポンプを用いたカニクイザル卵巣刺激法の検討第56回日本実験動物学会総会 埼玉(5/14-5/16).

山崎樹里, 岡原(成田)純子, 岩谷千鶴, 土屋英明, 鳥居隆三(2009)カニクイザル凍結胚由来産子の獲得第56回日本実験動物学会総会 埼玉(2009/5/14-5/16).

鳥居隆三(2009)生殖・再生医療研究におけるサルの有用性, 第54回日本生殖医学会総会・学術講演会, 金沢(11/22-23/09)(特別講演)

附属ナノ再生医工学研究センター Research Center for Nano Medical Engineering

ナノバイオプロセス研究領域 Department of Nano Bioprocess

分野主任 教授 楠見 明弘

Prof. Akihiro Kusumi

【研究概要】

1. 生きている細胞中での1分子観察と操作法の開発

世界的には、in vitroでの1分子観察と操作ができる研究室は増えてきている。しかし、私達の研究室の特徴は、1分子観察と操作を生細胞中でおこなうことで、それによって、1分子細胞生物学が可能になった。具体的には生きている細胞中の1分子を、マイクロ秒レベルの時間分解能、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、それらの分子の活性化(反応)までも1分子毎に見る方法を開発してきた(これらは世界でも我々のみ)。これは、ナノサイエンス／ナノテクノロジーとの融合領域として、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物学という新しい学問分野の創造につながりつつある。

なお、以下の発見は、1分子法を使って初めて可能になったものであり、単なる生細胞中でのイメージングや多数分子の計測では不可能であったものばかりである。

2. 細胞膜の基本的な構造と、働き方について

細胞膜は2次元の液体(連続体)と考えられてきた。しかし、私達は、(1)細胞膜はコンパートメント化されていること、(2)これは細胞膜に取り込まれた全ての分子に対して働くこと、(3)その機構は、基本的にはアクチン膜骨格によるもので、膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質が拡散障壁として働くこと、などを示した。これは、シンガー－ニコルソンモデルに重要な変更を迫るものであり、膜の構造と働き方について、基本的なパラダイムシフトを起こした研究である。

さらに最近、電子線トモグラフィー法を用いて、細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化することに成功した。細胞膜試料として、細胞膜の内側表面を急速凍結ディープエッチ白金レプリカに写し取ったものを用いた。これによって、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めたところ、それが、膜分子の拡散によって得られたコンパートメントの大きさとピッタリと一致した(図1参照)。

受容体はシグナルを受けた後、会合して運動を停止するものが多いが(シグナルが来た位置を数十秒程度記憶する)、これは、会合体が膜骨格によるコンパートメントに閉じ込められるか、膜骨格に結合することによることがわかった。さらに、神経細胞の細胞膜には脂質をも通さない拡散障壁が生じるが、これも、アクチン膜骨格とここに結合する膜貫通型タンパク質が密に集合することによって出来ることを示した。

3. シグナル伝達の基本的な仕組みについて

シグナル伝達は、多くの場合、シグナル分子のランダムな拡散運動と衝突によって担われると考えられてきた。

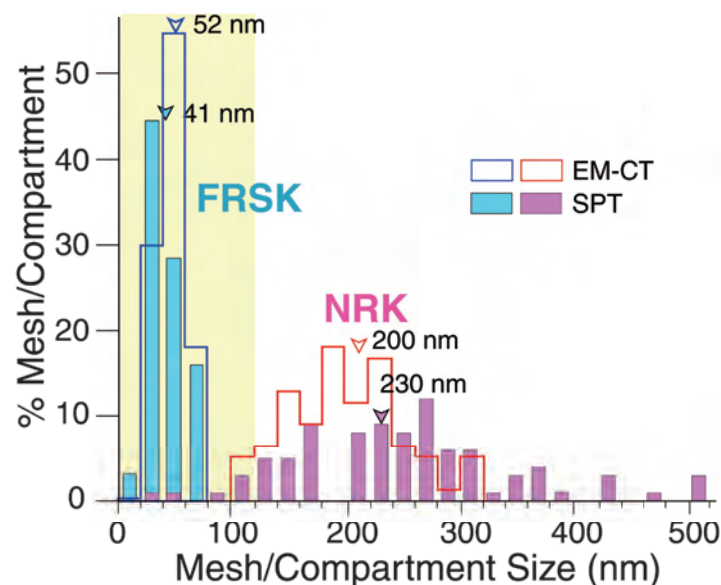


図 1

細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤がNRK細胞、青が、FRSK細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる2種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

近年の、多くの足場タンパク質の発見は、これとは全く逆に、上流と下流の分子は、足場タンパク質が関与する場合にはずっと結合しているものであり、シグナルが来たら、固体の電気回路のように、シグナルを伝えるものであると考えられるようになった。しかし、私達は、ある分子が活性化されると、それに結合する足場タンパク質、下流分子などが急速に集まって信号複合体を形成すること、それらの多くは安定ではなく1秒以下の寿命で分解(不活化)する、ことを見いだした(Ras-Rafの系、ラフトの関与する系)。すなわち、1回毎のシグナル伝達は量子化されており、多数分子の平均として観察される生化学やイメージングによるシグナル変化は、これらの量子的なパルス状のシグナルの和であり、それを担うのがこれらの短寿命シグナル複合体であることが示された。これは、シグナル系のシステムとしての働き方を理解するためには、極めて重要な知見で、きわめて動的なシグナル分子の組織化によるシステム動作の一端が見えてきたと言える。

[Summary of Research]

Paradigm shift of the concept of the plasma membrane structure

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (Fujiwara et al., 2002; Murase et al., 2004; Kusumi et al., 2005; Morone et al., 2006). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous 2-dimensional fluid to the compartmentalized, structured system. This could be found because we have developed high time resolution (25 microseconds) single-molecule tracking techniques (Kusumi et

al., 2005). If more than one molecule is observed at the same time, the single hop event would be masked by averaging over all the molecules under observations. Without high-time resolutions, the residency time within a compartment for 1 ms to 1 s could not be detected.

Single-molecule force microscope

An ultra-sensitive, single-molecule optical force scanning probe microscope was developed that uses a single membrane molecule as a probe. This microscope measures the interaction force between the membrane-molecule probe with the membrane skeleton mesh in live cells, and, by mapping the force, images of the membrane skeleton that interact with the membrane molecule were obtained (Ritchie et al., in preparation). A theoretical framework was developed to understand/predict the behavior of single membrane molecules being dragged by the optical trap (Ritchie et al. in preparation).

Detection of transient interactions of two species of molecules in living cells

Two species of molecules were labelled in different colors, and a method to detect their colocalization at the level of single molecules was developed for the first time (Koyama et al., 2005).

Single-molecules FRET imaging of H-Ras activation in living cells

The activation of H-Ras, a GTP-binding protein involved in the signaling pathways for cell proliferation and reorganization of the cytoskeleton, was visualized at the level of individual molecules using a technique called single-molecule fluorescence resonance energy transfer (single-molecule FRET ; Murakoshi et al., 2004 ; Kusumi and Murakoshi, 2005). Activation of H-Ras takes place only temporarily (<2 s), and is accompanied by transient immobilization, which is likely due to the transient formation of an activated-Ras signaling complex with scaffolding proteins.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文・総説

A. Kusumi, Y. Shirai, I. Koyama-Honda, K. G. N. Suzuki, and T. K. Fujiwara. Hierarchical organization of the plasma membrane : investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy. FEBS Lett. (2009) (in press)

2) 和文総説

楠見明弘, 藤原敬宏 : カラム : ランダムな運動に法則を見出す. 「変化をとらえる」(高橋陽一郎著, 東京図書, 東京) 238-247 (2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 国際学会・外国の学会

1A) 国外開催

K. G. N. Suzuki, and A. Kusumi: Mechanism for raft-based signal transduction as studied by single-molecule tracking. 5th Leukocyte Signal Transduction Workshop(2009.6. 13-18 Crete, Greece)

A. Kusumi: Signal transduction of GPI-anchored proteins as studied by single-molecule tracking analysis. The EMBO meeting 2009(2009.8 .29-9.1 Amsterdam, The Netherlands)

1B) 国内開催

A. Kusumi: Signal transduction via meso-scale raft domains as studied by single-molecule tracking. The Fourth iCeMS International Symposium(2009.5.27-29 Kyoto, Japan)

K. G. N. Suzuki: Mechanism for raft-based signal transduction via GPI-anchored receptors as revealed by single-molecule tracking. 59th FCCA Seminar(2009.10.20 Tokyo, Japan)

A. Kusumi: Single-molecule imaging-induced paradigm shift of the plasma membrane dynamics, structure, and signal transduction. JST/CREST Symposium: WBMA'09 Watching Biomolecules in Action(2009.12. 15-17 Osaka, Japan)

2) 国内での招待講演

楠見明弘: 細胞膜の領域構造が可能にする細胞情報伝達, 文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究成 18 年度 ~22 年度非平衡ソフトマター物理学の創成: メソスコピック系の構造とダイナミクス 第 3 回領域研究会 (2009.1.7-9 福岡)

楠見明弘: 細胞膜ドメイン構造がはたらく仕組み: 1 分子ナノ操作・追跡による研究, 文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究 マルチスケール操作によるシステム細胞工学(バイオ操作)第 7 回公開シンポジウム (2009.3.6 仙台)

楠見明弘: 1 分子で見る細胞膜上のシグナル変換, 日本顕微鏡学会 第 33 回関東支部講演会「顕微鏡 3D イメージングの最前線」(2009.3.7 東京)

楠見明弘: 1 分子追跡が明らかにする細胞膜上のデジタル式情報変換機構, 東北大学理学研究科グローバル COE プログラム「物質階層を紡ぐ科学フロンティアの新展開」: 「膜の研究会」(2009.3.7-9 仙台)

楠見明弘: 1 分子追跡が明らかにする細胞膜ラフトの協同的スイッチ機構, 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム S16「新しいマイクロイメージング法を用いた形態形成と遺伝子機能の解析」(2009.3.28-30 岡山)

藤原敬宏: 超高速 1 蛍光分子追跡法による, コンパートメント化された細胞膜内でのリン脂質のホップ拡散の検出, 第 61 回日本細胞生物学会大会 ランチョンセミナー 1(2009.6.2 名古屋)

笠井倫志: 1 分子イメージングで GPCR の 2 量体形成を解明する, 第 61 回日本細胞生物学会大会 ランチョンセミナー 1(2009.6.4 名古屋)

楠見明弘: 細胞膜メゾドメインのバイオコントロール, 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究 マルチスケール操作によるシステム細胞工学バイオコントロールシンポジウム(2009.8.21 東京)

楠見明弘: GPI アンカー型分子のラフト依存短寿命ホモダイマー, 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生

体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 21 年度第 1 回班会議 公開シンポジウム(2009.8.26-28 熊本)

楠見明弘：ラフト領域の働きを 1 分子追跡で解く，第 29 回日本糖質学会年会シンポジウム「生命－分子が語る，細胞が語る」(2009.9.9-11 高山)

楠見明弘：細胞膜シグナル変換の仕組みを 1 分子追跡で解く，第 33 回星薬科大学大学院研究科助手会・大学院自治会 合同公開セミナー(2009.10.10 東京)

藤原敬宏：Compartmentalization of the plasma membrane by actin-based membrane skeleton as revealed by high-speed single fluorescent-molecule tracking, 第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム 1S12a 「細胞表層組織化の統合的理解を目指して」(2009.10.21-24 神戸)

楠見明弘：細胞膜シグナル変換のスイッチを可能にする準安定ナノ・メゾドメイン，第 25 回 Wako ワークショップ「細胞膜ナノドメイン：統合的理解と新たな展開」(2009.11.17 東京)

シミュレーション医工学研究領域 Research Center for Nano Medical Engineering Institute for Frontier Medical Sciences

【研究概要】

本研究室では，生体組織と力学的に調和する生体材料や人工臓器の開発など生体機能の再生を目的とした診断・治療の支援を行うために，コンピュータ科学や材料工学の手法を用いて，以下のような基礎的ならびに応用的研究を行っている。

1. 生体組織の力学的適応変形に関するシミュレーション

生体組織の力学的特性の解明を基本として，特に骨のモデリングならびにリモデリング現象など生体組織の力学的合理性の適応変形過程などについて数値シミュレーションを行っている。その結果，等応力分布あるいは等歪エネルギー密度分布などの制約関数に従って，各種骨組織の形態が形成されていることが示唆され，この制約の下に，生体組織と力学的に調和する人工関節等のインプラントのデザインの創生を試みている。(新エネルギー・産業技術総合開発機構助成金)

2. 人工歯根周囲における歯根膜の再生

現在の人工歯根は，天然歯根のように歯根膜を持たず，直接顎骨に固定させるので，咀嚼時の動的荷重が緩衝されず直接顎骨に伝わる。その結果，歯槽骨に過大な応力が発生して骨吸収が起こり，ゆるみが生じる危険性が高い。そこで，チタン製人工歯根をポリマーで被覆し，表面処理により細胞接着性タンパク質であるコラーゲンを固定化し，さらにその上に歯根膜細胞を培養し，歯根膜ならびにセメント質の再生を図っている。(文部科学省科学研究費補助金)

3. MR Elastography (MRE) による in vivo 弾性率データの計測，解析および検証

磁気共鳴弾性率計測法(MRE)は，MRI をベースとする新たな測定技術であり，これによる体内組織・器官の非

侵襲性弾性率計測の手法を確立し、医療研究支援用の生体組織データベースを構築する。また触感デバイスを用いた人工現実感(VR)によるVRモデルシステムを開発している。(医学研究科情報学専攻との共同研究)

4. 人工関節軟骨・人工椎間板などの医療用ハイドロゲル

関節軟骨が持つ優れた力学的特性を具備した人工関節軟骨材を開発することにより、関節の病変部のみを置換し健全な軟骨下骨梁を残す新しい人工関節軟骨の開発を目指している。当研究室にて新しく開発した高強度・高弾性率ポリビニルアルコールハイドロゲルは人工関節軟骨・椎間板材料として有望である。(医学研究科整形外科講義との共同研究、厚生労働省科研費)

5. 耐摩擦・摩耗特性に優れた人工関節用ポリエチレン

人工関節の摺動部に使用される超高分子量ポリエチレンの摩耗粉により発生する不良肉芽組織が骨吸収を惹起する異物反応が問題となっている。そこで、物理的な改良法により最終成形物に分子配向と結晶面配向を導入することにより、耐摩耗性の改良を試み、良好な結果が得られている。

6. ポリフェノールによる細胞増殖制御と生体組織の長期間保存

緑茶ポリフェノール成分であるエピガロカテキンガレート(EGCG)が細胞・組織の保護作用を持つことを発見し、生体組織の保存に応用する研究を行っている。角膜に関しては、既存の角膜保存液は約1週間の保存期間であったが、EGCGを添加することにより2週間の保存期間でも上皮、内皮ともに形態、機能を維持することができる保存液を開発した(京都府立医科大学眼科教室共同研究)。

末梢神経を約4週間保存し、その後移植することで拒絶無く生着させる事が可能であることを見出した(京都大学医学部整形外科共同研究)。

臍島は凍結解凍によりダメージを受けインスリン分泌能などが低下するため臨床用には凍結保存法は採用されていない。我々は凍結障害を防止し、形態・機能共に維持したまま保存することが可能であることを示した(京都大学医学部移植外科共同研究)。

EGCGで組織を処理することにより移植後の急性期拒絶を抑える可能性を見出した。マウスリンパ球の表面抗原の解析を行い、EGCGが免疫細胞の抗原認識を一部阻害することが原因であることを突きとめ、リンパ球移植実験で効果を確認した。この技術を用いることにより将来的に免疫抑制剤の投与量を減少させることが期待される。

EGCGで移植用血管を処理することで移植後の内膜肥厚を抑制し狭窄を予防できることを発見した。これにより心臓疾患治療のための冠動脈バイパス手術の成功率を高めることが可能である(京都大学医学部心臓血管外科共同研究)(日本科学技術振興機構プレベンチャー事業、文部科学省科学研究費基盤研究B)

7. 人体に優しい義歯床

現在、臨床で広く使用されている義歯床として、加熱重合タイプのポリメチルメタクリレート(PMMA)と、射出成型タイプのポリサルホン(PS)やポリカーボネート(PC)が知られている。加熱重合タイプのPMMAは、重合に伴う収縮率が高く、耐衝撃性等の力学的特性に劣る上、特に残留モノマーが多いため、使用時に残留モノマーの溶出によるアレルギー反応が惹起されることが指摘されており、生体に対する安全性の問題が残っている。

そのため、これに替わる材料としてPSやPCが射出成型用義歯床として使用されるようになって来た。ところがPSは耐衝撃性に劣り、またPCについても、残留モノマーであるビスフェノールが、近年環境ホルモンとしての毒性が大きく取り上げられている。さらにPMMA補修部材としての接着性が悪い為、人体にとって安全で、しかも耐衝撃性等の力学的特性に優れ、残留モノマーが少ない義歯床が切望されてきた。

本研究では、残存モノマーが極めて少なく、刺激や毒性のない人体に優しいのみならず、耐衝撃性や高曲強度で、耐久性に優れた射出成型タイプの義歯床を開発し、臨床の場に提供できた。(近畿経済産業局速攻型地域新生コン

ソーシアム研究開発事業)

8. 生分解性を有する2液反応型の新規医療用接着剤

生体接着剤の中で多くの分野で大量に使用されているのはフィブリン糊である。しかし、血液凝固作用を利用した血液製剤であるため、C型肝炎の感染症問題が非常に大きな社会問題となっている。現状は、各病院ともフィブリン糊の使用に際して、患者よりC型肝炎のリスクがあることを理解している旨の承諾書を取った上で使用されており、フィブリン糊に代わる安全性の高い医療用シーラントの出現が切望されている。また、フィブリン糊の接着力は低く創傷面から剥がれやすいこと、および生体内での分解が早すぎることも問題視されている。

現在までの研究で、分解速度が任意にコントロール可能であること、フィブリン糊より柔軟性が高いこと、毒性が極めて低いこと、フィブリン糊より接着力が高いこと、食品添加物を原料とするため安価で提供できることなどが分かった。更に、心臓血管外科領域での血管の止血、胸部疾患外科領域での肺の空気漏れ閉塞、および消化器外科領域での肝臓の止血など種々の用途での動物実験の良好な結果に基づいて、新規医療用接着剤として実用化でき臨床応用の可能性を見出した。(新エネルギー・産業技術総合開発機構)

9. DMSO・血清フリーの不凍ポリアミノ酸によるiPS細胞の凍結保存

培養細胞を利用した研究は生物学や医学分野において欠かせないものであり、各種細胞の維持、保管は主に液体窒素などを用いた低温保存により行われている。培養細胞だけでなく、受精卵や精子などの生殖細胞や血液細胞なども凍結保存されている。また、再生医療に有用な幹細胞も移植前には凍結保存されることが想定される。その際、細胞の機能や生存率をできるだけ維持するため、凍結に由来する様々な障害を防止する目的で凍害防御剤を添加する必要がある。凍害防御剤としてはジメチルスルホキシド(DMSO)やグリセリンなどが挙げられる。DMSOは細胞内に浸透し氷晶の形成を抑制することで凍結時の細胞へのダメージを軽減していると言われ、またグリセリンは細胞を脱水すると共に細胞内において水の結晶化を抑制していると言われる。しかしDMSOは毒性が高く解凍時に速やかに除去する必要がある。また細胞によっては分化に影響を及ぼすなどの問題点があるため、毒性が低く効果の高い凍害防御剤の開発が望まれている。当研究室では、世界で初めて異種たんぱく質の血清フリーで、しかもDMSOと同等以上の凍害防御機能のある高分子化合物を開発した。

1. Simulation of Biomechanical Adaptation Process of the Living Tissues.

Numerical simulations are carried out especially on the modeling and remodeling phenomena of the bones as the biomechanical adaptation. With constraint functions such as stress distribution or strain energy density distribution, it is indicated that the form of the bone has been modeled, and the design of artificial dental roots which dynamically harmonizes with the living tissue under this constraint has been tried. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

2. Regeneration of the periodontal Membrane around Dental Implant Roots.

The present artificial dental root is fixed directly in the alveolar bone without having periodontal ligament like natural tooth root, the stresses are directly transmitted without any damping effect. The excessive stresses in the alveolar bone may arise and cause the bone resorption by which the loosening of the implants occurs. Therefore, we have been attempting that the dental implant made of titanium is covered with a polymer, and the collagen which is the cell adhesive protein is fixed by some surface treatments, and in addition, the periodontal ligament cell is cultivated on the surface for regeneration of the periodontal membrane. (Supported by Ministry of Culture, Science and Education)

3. MR Elastography Measurement, Analysis and Verification.

Magnetic resonance elastic modulus measurement method (MRE) of the elastic modulus is a new measuring technique based on the MRI, and it establishes the technique of the noninvasive elastic modulus measurement of the living tissue and organ in vivo. Database construction for the medical research support, and virtual reality (VR) system using the haptic device are investigated. (Joint Research with Information Division, Kyoto University)

4. New Artificial Articular Cartilage and Intervertebral Disk.

Development of the artificial cartilage and intervertebral disk is necessary in order to recover support and mobility simultaneously in joints and spine which received the damage. We examined the possibility of the application of polyvinyl alcohol hydrogel which can control the mechanical strength by the change of water content and is excellent in the biocompatibility. It replaces only lesion part and leaves the sound subchondral bone. The high strength and high elastic modulus of the polyvinyl alcohol hydrogel newly developed in this department is promising as artificial articular cartilage and intervertebral disk material. (Supported by Japan Ministry of Health, Labour and Welfare)

5. Polyethylene for Artificial Joints with High Wear Resistance.

The wear particles of polyethylene are produced by the friction between the metal and UHMWPE when artificial joint used for the long term. It is known that the osteolysis occurs by foreign body granulation tissue which the wear particle induces. The development of new UHMWPE for artificial joint which controlled super structure by the crystallization under molecular orientation is being tried in order to improve abrasion resistance of UHMWPE.

6. Proliferation Control of Mammalian Cells and Tissue Preservation for Long Term.

EGCG, a green tea polyphenol, not only improves preservation of non-frozen tissues such as cornea, nerves, and pancreatic but solves some potential problems pertaining to transplantation and cardiovascular medicine. EGCG with its immuno-suppressive and anti-proliferative effects prevents graft rejections in various tissues and neo-intimal hyperplasia in vein grafts, respectively. Therefore, the use of EGCG for preserving the living tissues and controlling their cellular responses will provide us a starting point to advance the future of regenerative medicine. (Supported by Japan science and technology)

7. The gentle denture base in human body

Today, we are researching and developing novel thermoelastic denture base composed of polymethyl-metacrylate(PMMA) as a main component for injection molding. Denture base is generally employed polycarbonate(PC) as thermoelastic resin. However, PC is eluted in one's mouth, bis-phenol A of an environmental pollution, and furthermore, poor adhered to PMMA resin of repair adhesive. Heat-polymerized type PMMA mainly employed as denture base, is eluted in one's mouth a lot of monomer and oligomer, which come from residue product of polymerization, and is anxious to cause an allergy. We are researching and developing novel thermoelastic denture base which overcomes disadvantages of traditional denture resin. (Supported by Kinki area economy department of industry)

8. Biodegradable Medical Adhesives

The closing, sealing, and bonding of wounds and defects in various types of tissue still remain problem areas in the field of medicine. To bond a soft tissue interface, numerous studies have been conducted to develop either synthetic or semi synthetic tissue adhesives. Cyanoacrylate, aldehyde-based, and fibrin glue have all been developed

for clinical usage. However, some problems have led to limitations in their application, such as toxicity and virus infection.

We recently developed functional medical adhesive of dextran based reactive glue, consisting of aldehyded dextran and ϵ -poly (L-lysine), two kinds of medical and food additives, as starting materials. Biocompatibility assay indicated that the functional medical adhesive showed excellent biocompatibility with in vitro and in vivo and most of the functional medical adhesive was histologically degraded within 4 weeks. The excellent performance was observed in comparison to the use of conventional fibrin glue. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

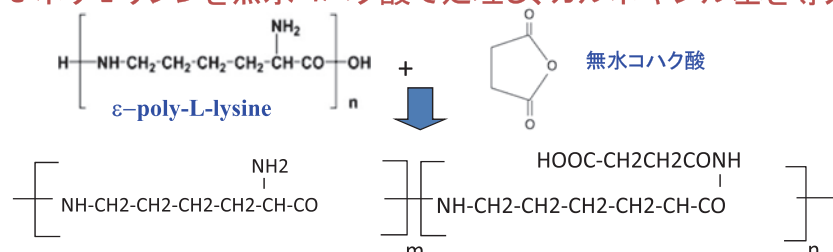
9. Antifreeze Polyamino Acid with the Cryoprotective Function

Cryoprotective agents (CPAs) such as dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol, and propylene glycol have been used for the cryopreservation of cells and tissues. DMSO is the most effective CPA but shows high cytotoxicity and can effect differentiation. ϵ -poly-L-lysine (PLL) derivatives show higher cryopreservation efficiency than the conventional CPAs. Culture medium solutions with 7.5 w/w% of PLL whose amino groups of more than 50 mol% were converted to carboxyl groups by succinic anhydride showed higher post-thaw survival efficiency of L929 cells than those of current CPAs without the addition of any proteins. In addition, rat mesenchymal stem cells were cryopreserved more effectively than with DMSO and fully retained the potential for proliferation and differentiation. Furthermore, many kinds of cells could be cryopreserved with PLL having the appropriate ratio of COOH groups, regardless of the cell types, including adhesive and floating cells, human and mouse derived cells, primary cells and established cell lines. The properties might be associated with the antifreeze protein properties. These results indicate that these polymeric extracellular CPAs may replace current CPAs and the high viability after thawing and non-necessity of serum ensure that these CPAs may be used in various preservation fields.

DMSO・血清フリーな凍結保存液 新規凍害保護剤の創製

DMSOが最も保存効率が良いが、毒性も高い。しかし、毒性が低く、効果の高い凍害防御剤の開発が望まれている。また、半世紀にわたり感染が懸念される血清フリーな安全で保存効果の高い代替物質は発見されていない。

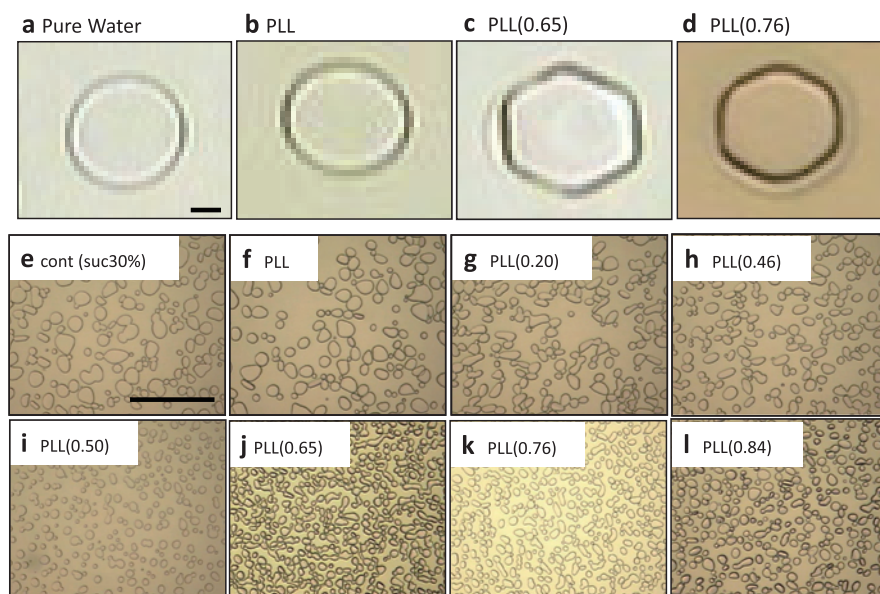
ϵ -ポリ-L-リジンを無水コハク酸で処理し、カルボキシル基を導入



一分子にプラスとマイナスに荷電した官能基を両方持つ高分子
Polyampholyteである不凍ポリアミノ酸の細胞凍結保護効果を発見

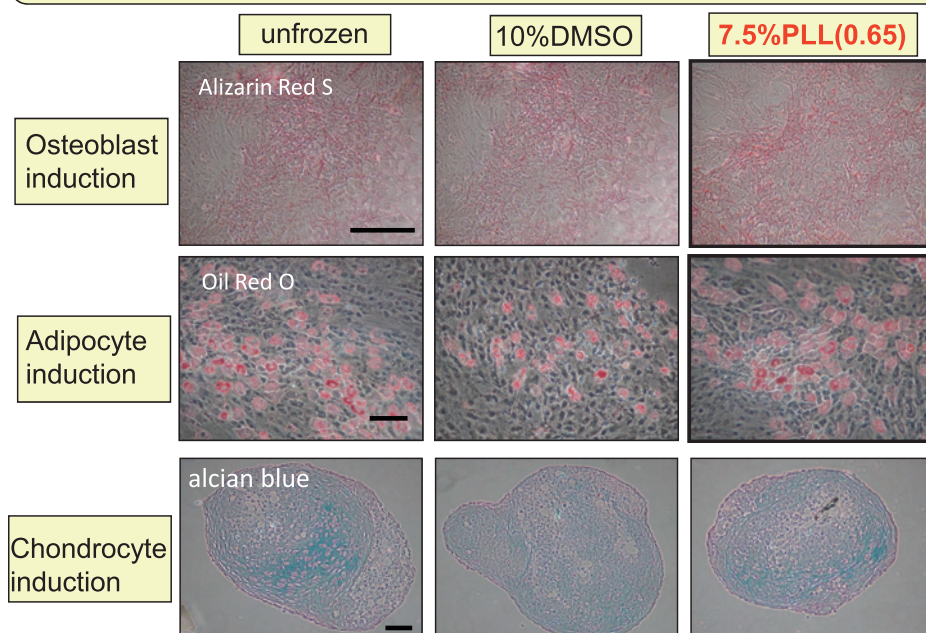
カルボキシル基導入PLLに幹細胞の凍害防御効果があることを見出した

Antifreeze protein like activities of COOH-PLL



(a–d) Morphologies of ice crystals of (a) pure water and in the presence of 7.5% (w/w) of (b) intact PLL, (c) PLL (0.65), and (d) PLL (0.76). Scale bar, 10 μ m. (e–f) Inhibition of ice recrystallization of (e) 30% sucrose control and in the presence of 7.5% (w/w) of (f) intact PLL, (g) PLL (0.20), (h) PLL (0.46), (i) PLL (0.50), (j) PLL (0.65), (k) PLL (0.76), and (l) PLL (0.84) with 30% (w/w) sucrose solution. Bar, 100 μ m.

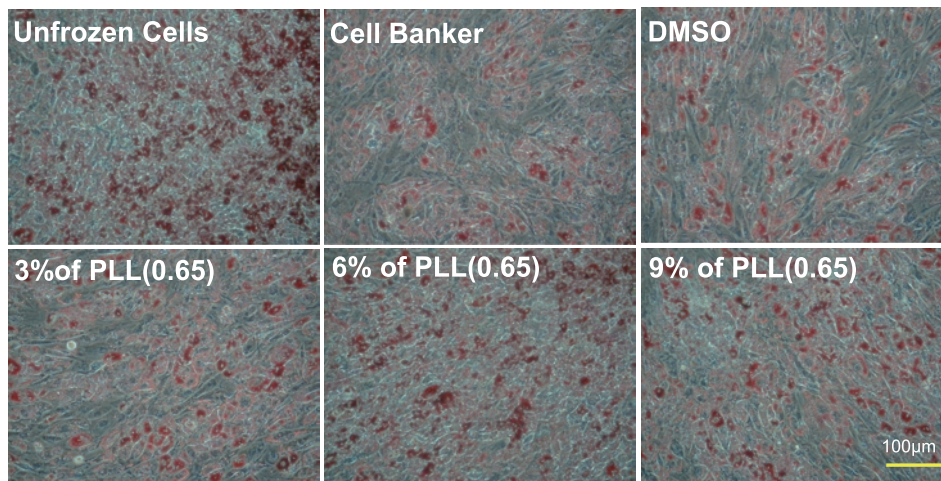
Differentiation of RMSCs after cryopreservation



Each type of differentiation depended specifically on each induction and inappropriate differentiation did not occur in cryopreservation with PLL (0.65) without FBS

Adipogenic differentiation of ADSC

Adipogenic medium : High glucose DMEM supplemented with 0.5mM IBMX, 1 μ M dexamethasone, 10 μ M insulin, 200 μ M indomethacin, 1% antibiotics and 10% FBS



14 days After inducing adipogenesis (Oil Red O staining; lipid droplets)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Matsumura, K., Hayami, T., Hyon, S-H., Tsutsumi, S. : Control of proliferation and differentiation of osteoblasts on apatite coated poly (vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage material. *Journal of Biomedical Materials Research* (in press) Mar 25. [Epub ahead of print](2009)
- Matsumura, K., Takayama, H., Bae, J- Y., Kurihara, M., Tsutsumi, S., Hyon., S-H. : Preservation of platelets by adding epigallocatechin-3-/O/-gallate to platelet concentrates. *Cell Transplantation* **18** : 521-528(2009)
- Matsumura, K., Hyon, S-H. : Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials* **30** : 4842-4849(2009)
- Matsumura, K., Bae J-Y., Hyon, S-H. : Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. *Cell Transplant.* (in press)
- Azuma, T., Ito, J., Kutsuki, M., Nakai, R., Fujita, S., Tsutsumi, S. : Analysis of the mandibular movement by simultaneous multi-section continuous ultrafast MRI. *MRI*. **27**(3): 423-433(2009)
- Azuma, T., Nakai, R., Takizawa, O., Tsutsumi, S. : In vivo structural analysis of articular cartilage using diffusion tensor MRI. *MRI* **27**(9): 1242-1248(2009)
- Ino, T., Nakai, R., Azuma, T., Kimura, T., Fukuyama, H. : Recognition and reading aloud of kana and kanji word. An fMRI study. *Brain Res Bull.* **78** (4-5): 232-239(2009)
- Ino, T., Nakai, R., Azuma, T., Kimura, T., Fukuyama, H. : Differential activation of the striatum for decision making and outcomes in a monetary task with gain and loss. *CORTEX*. **46**(1): 2-14(2009)
- Ichihara, S., Inada, Y., Nakada, A., Endo, K., Azuma, T., Nakai, R., Tsutsumi, S., Kurosawa, H., Nakamura, T. : Devel-

- opment of new nerve guide tube for repair of long nerve defects. *Tissue Eng Part C Methods*. **15**(3): 387-402 (2009)
- Kim, H., Kawazoe, T., Suzuki, S., Matsumura, K., Hyon, S-H.: Long-Term Preservation of rat skin tissue by epigallocatechin-3-gallate. *Cell Transplant*. **18**(5): 513-519 (2009)
- Bae, J-Y., Kanamune, J., Han, D-W., Matsumura, K., Hyon, S-H.: Reversible regulation of cell cycle-related genes by epigallocatechin gallate for hibernation of neonatal human tarsal fibroblasts. *Cell Transplantation* **18**(4): 459-469 (2009)
- Bae, J-Y., Matsumura, K., Wakitani, S., Kawaguchi, A., Tsutsumi, S., Hyon, S-H.: Beneficial storage effects of epigallocatechin-3-o-gallate on the articular cartilage of rabbit osteochondral allografts. *Cell Transplantation* **18**: 505-512 (2009)
- Bae, J-Y., Han, D-W., Wakitani, S., Nawata, M., Hyon, S-H.: Biological and biomechanical evaluations of osteochondral allografts preserved in cold storage solution containing epigallocatechin gallate. *Cell Transplantation* (in press)
- Bae, J-Y., Han, D-W., Matsumura, K., Wakitani, S., Nawata, M., Hyon, S-H.: Non-Frozen preservation of articular cartilage by epigallocatechin-3-gallate reversibly regulating cell cycle and NF- κ B expression. *Tissue Engineering Pt. (in press)*
- Araki, M., Tao, H., Sato, T., Nakajima, N., Nagayasu, T., Nakamura, T., Hyon, S-H.: Development of a new tissue-engineered sheet for reconstruction of the stomach. *Artif Organs* **33**(10): 818-826 (2009)
- Takaoka, M., Nakamura, T., Sugai, H., Bentley, A.J., Nakajima, N., Yokoi, N., Fullwood, N.J., Hyon S-H., Kinoshita, S.: Novel sutureless keratoplasty with a chemically defined bioadhesive invest ophthalmol. *Vis Sci*. Jan 10. **50**(6): 2679-2685 (2009)
- Kashiwa, K., Kotobuki, N., Tadokoro, M., Matsumura, K., Hyon, S-H., Yoshiya, S., Ohgushi, H.: Effects of epigallocatechin gallate on osteogenic capability of human mesenchymal stem cells after suspension in phosphate-buffered saline. *Tissue Engineering: Part A*, (in press)
- Osterburg, A., Gardner, J., Hyon, S-H., Neely, A., Babcock, G.: Highly antibiotic resistant acinetobacter baumannii clinical isolates are killed by the green tea polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Clinical Microbiology and Infections* **15**: 341-346 (2009)
- Miskon, A., Yamaoka, T., Hyon, S-H.: Preservation of porcine hepatocytes in 3d bioreactor at room temperature using epigallocatechin-3-gallate. *Tissue Engineering* **15**(3): 345-353 (2009)
- Han, D-W., Lee, J- J., Jung, D-Y., Park, J-C., Hyon, S-H.: Development of epigallocatechin gallate-eluting polymeric stent and its physicochemical, biomechanical and biological evaluations. *Biomedical Materials*. **4**(4) (2009)
- Han, D-W., Bae, J-Y., Hyon, S-H.: Biochemical and histological evaluations of articular cartilages preserved in cold storage solution containing green tea catechin, EGCG. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **6**(1-3): 380-387 (2009)

2) 著 書

- Han, D-W., Hyon, S-H., Park, J-C.: Protection and preservation of vascular cells and tissues by green tea polyphenols. [Polyphenols and Health *New and Recent Advances*] (Neville Vassallo, Nova Biomedical Books, New York)

Chap. IV, 87-111 (2008)

3) 総 説

玄 丞休, 中島直喜: 安全性と機能性に優れた医療用接着剤 “LYDEX” 工業材料 Vol.57 No.6: 28-33 (2009)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

玄 丞休, 松村和明: 不凍活性を有するポリアミノ酸の合成と物性 第 134 回ポバル会 (2009.7.4 京都)

Hyon, S-H., Nakamura, J., Matsumura, K., Nakajima, N.: Cross-Linkable Dextran Composite for Adhesion Prevention Material. 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (2009.7.18-22 Copenhagen)

Hyon, S-H., Sugai, H., Nakajima, N.: Cross-linkable dextran composite for adhesion prevention material. 22d European Conference on Biomaterial (2009.9.7-11 Lausanne)

玄 丞休, 堀内 亮, 松村和明, 高橋健太, 西野 孝: PVA ハイドロゲルを用いた人工半月板. 第 58 回高分子討論会 (2009.9.16-18 熊本)

玄 丞休, 堀内 亮, 松村和明, 高橋健太, 西野 孝, 小林正典: 人工半月板用の PVA ハイドロゲル. 第 36 回日本バイオメカニクス学会 (2009.10.16-17 松山)

松村和明, 玄 丞休: ジメチルスルホキシドに代わる新規細胞凍結保存剤の開発 第 8 回日本再生医療学会 (2009.3.5-6 東京)

Matsumura, K., Hyon, S-H.: Development of polyampholytic cryoprotective agents as alternatives to DMSO 2nd TERMIS world congress. (2009.8.31-9.3 Seoul)

松村和明, 林 文晶, 長島敏雄, 玄 丞休: ポリリジン由来両性高分子電解質による細胞凍結保護作用 第 58 回高分子討論会 (2009.9.16-18 熊本)

松村和明, 玄 丞休: ポリリジン由来両性電解質ポリマーによる細胞凍結保存効果 第 31 回バイオマテリアル学会 (2009.11.16-17 京都)

松村和明, 速水 尚, 西川博昭, 濱畑あかり, 本津茂樹, 玄 丞休: 疑似体液由来ハイドロキシアパタイト薄膜コートの骨芽細胞への影響 第 31 回バイオマテリアル学会 (2009.11.16-17 京都)

東 高志, 中井隆介, 加藤希理子, 瀧澤 修, 堤 定美, 玄 丞休: Diffusion Tensor MRI を用いた in vitro と in vivo における関節軟骨の構造解析. 第 35 回日本磁気共鳴医学会大会 (2009.10.1-3 神奈川)

中井隆介, 東 高志, 加藤希理子, 岸本泰蔵, 平田多津子, 瀧澤 修, 玄 丞休: Binomial RF pulse を用いた腹部脂肪領域の撮像および計測手法の開発. 第 35 回日本磁気共鳴医学会 (2009.10.1-3 神奈川)

Kim, H-H., Matsumura, K., Bae, J-Y., Hyon, S-H. : Protective effects of carboxylated poly-L-lysine on hypothermic preservation of mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. The 8th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine (2009. 3.5-6 Tokyo)

Kim, H., Matsumura, K., Bae, J-Y., Hyon, S-H. : Hypothermic preservation of human hepatocytes with carboxylated poly-L-lysine CTS-JSOPMB Joint Conference (The Okayama 2009 Joint Conference brings together two

- Meeting of CTS-Cell Transplant Society JSOPMB-Japan Society for Organ Preservation and Medical Biology) (2009.4.20-21 Okayama)
- Kim, H., Matsumura, K., Bae, J-Y., Hyon, S-H. : Protective effects of carboxylated poly-L-lysine on hypothermic preservation of mouse induced pluripotent stem(iPS)cells. CTS - JSOPMB Joint Conference (The Okayama 2009 Joint Conference brings together two Meeting of CTS - Cell Transplant Society JSOPMB - Japan Society for Organ Preservation and Medical Biology) (2009.4.20-21 Okayama)
- Kim, H., Matsumura, K., Bae, J-Y., Hyon, S-H. : Protective effects of carboxylated poly-L-lysine on hypothermic preservation of mouse induced pluripotent stem(iPS)cells. 2nd TERMIS world congress. (2009.8.31-9.3 Seoul)
- 裴 庭胤, 松村和明, 玄 丞然 : ポリリジン (polylysine)誘導体を用いた種々の培養細胞の凍結保存. 第8回日本再生医療学会総会(2009.3.5-6 東京)
- Bae, J-Y., Matsumura, K., Kim, H-H., Hyon, S-H. : Application of Poly-L-lysine Derivatives to the Cryopreservation of Various Cells. 2nd TERMIS World Congress(2009.8.31-9.3 Seoul)
- 裴 庭胤, 松村和明, 金 学嬉, 玄 丞然 : ポリリジン (polylysine)誘導体を用いたヒト iPS 細胞の凍結保存. 第31回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 野村昌代 : Effect of combined use of daidzein and raloxifene on osteoblast-like cell. 日本歯科理工学会夏季セミナー(2009.8.5 大津)
- 中村淳一, 中島直喜, 松村和明, 玄 丞然 : 担瘤マウスに対する葉酸吸着水溶性タキソールの治療効果. 第25回日本DDS学会(2009.7.3-4 東京)
- 中村淳一, 中島直喜, 松村和明, 玄 丞然 : 担瘤マウスに対する葉酸吸着水溶性タキソールの治療効果. 日本バイオマテリアル学会第4回関西若手研究発表会(2009.8.7 大阪)
- 中村淳一, 中島直喜, 松村和明, 玄 丞然 : 担瘤マウスに対する葉酸吸着水溶性タキソールの治療効果. 第31回日本バイオマテリアル学会 (2009.11.16-17 京都)
- 加藤希理子, 玄 丞然 : ステレオコンプレックスポリ乳酸の骨固定材に関する研究. 第74回人工関節の機能高度化研究会(2009.3.21 岡山)
- 加藤希理子, 東高志, 中井隆介, 瀧澤修, 玄 丞然 : 超高速 MRI による多断面連続撮像法を用いた重力の影響における下顎運動解析. 第37回日本磁気共鳴医学会大会(2009.10.1-3 横浜)
- 加藤希理子, 玄 丞然 : ステレオコンプレックスポリ乳酸の骨固定材に関する研究. 第31回バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 高山 了, 玄 丞然 : 人工関節摺動部材ポリエチレンの放射線照射効果. 第77回人工関節の機能高度化研究会(2009.9.17 岡山)
- 高山 了, 玄 丞然 : 人工関節摺動部材の耐摩耗性改良. 第31回日本バイオマテリアル学会大会(2009.11.16-17 京都)
- 邵 仁哲, 東 高志, 中井隆介, 兼光紀幸, 納谷佳男, 落合 厚, 内藤泰行, 河内明宏, 藤原光文, 三木恒治 : 超高速 MRI を用いた勃起時の動的画像解析. 日本性機能学会第21回学術総会(2009.9.17-19 東京)
- 常俊顕三, 天満 敬, 東 高志, 中井隆介, 土井健人, 今村博敏, 太田剛史, 高木康志, 菊田健一郎 : ラット脳虚血モデル慢性期における Nifedipine の脳血流改善効果. 第68回日本脳神経外科学会学術総会(2009.10.14-16 東京)

- 竹田知史, 新実彰男, 猪野正志, 中井隆介, 東 高志, 井上英樹, 松本久子, 伊藤功朗, 大塚浩二郎, 小熊 毅, 中治仁志, 田尻智子, 岩田敏之, 三嶋理晃: Functional MRI による咳の中枢性機序解明の試み. 第 11 回日本咳嗽研究会(2009.11.14 名古屋)
- 朴 鍾喆, Kim Hye-Lee, 姜 在慶, 朴 奉柱, 金 正久, 玄 丞休, 田口英昭, 高鳥浩介: Aldehyded α -glucan と ϵ -poly(L-lysine) で作られた組織用接着剤の抗菌効果. 第 36 回日本防菌防黴学会(2009.9.14-15 大阪)
- Han, D-W., Kim, H-Y., Hyon, S-H.: Non-frozen preservation of tissues using green tea Polyphenols application to tissue engineering & regenerative medicine. 2nd TERMIS world congress. (2009. 8.31-9.3 Seoul)
- Han, D-W., Bae, J-Y., Hyon, S-H.: Characterization and transplantation of cartilage allografts preserved in cold storage solution containing green tea catechin, EGCG. The 7th China-Korea Symposium on Biomaterials and Nano-Biotechnology (2009.10. 19-23 Nanjing)
- Kim, H-Y., Lee, J-H., Park, J-C., Hyon, S-H., Han, D-W.: Physicochemical, biomechanical and biological evaluations of epigallocatechin gallate-eluting biodegradable polymeric stent. The 11th Pacific Polymer Conference (2009.11.6-10 Cairns)
- Jung, T-G., Kim, H-Y., Lee, J-H., Hyon, S-H., Han, D-W.: Biomechanical evaluations of epigallocatechin gallate-eluting PLCL copolymer for application to biodegradable coronary stents. The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Biomaterials (2009.11.27-28 Seoul)

2) 講演

- Hyon, Suong-Hyu: Development of the novel medical adhesive 「College of Biomedical Science & Engineering, Inje University, Busan, KOREA」(招待講演) (2009.1.5 Busan)
- 玄 丞休: 生分解性高分子ポリ乳酸の医療応用, 「プラスチック成形加工学会関西支部講演会」(招待講演) (2009.2.26 京都)
- 玄 丞休: 熱可塑性義歯床〈アクリショット™〉の開発と臨床応用, 「日本歯科理工学会夏季セミナー」(依頼講演) (2009.8.5 大津)
- Hyon, Suong-Hyu: The creation of antifreeze polyamino acid with the cryoprotective function, 「Annual Meeting of Korean Controlled Release Society」(招待講演) (2009.8.28 Jeju)
- Hyon, Suong-Hyu: Biodegradable biomaterials for regenerative medicine 「The 2nd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS)」(基調講演) (2009.9.2 Seoul)
- 玄 丞休: ヒトに優しい冠動脈用再狭窄防止ステント, 「第 47 回日本人工臓器学会大会」(依頼講演) (2009.11.13 新潟)
- 玄 丞休: 有機高分子系生体材料の基礎研究から臨床応用まで, 「第 31 回日本バイオマテリアル学会」(依頼講演) (2009.11.16 京都)



ナノバイオメカニズム研究領域 Department of Nano-Biomechanism

助教 都賀谷紀宏

Assist. Prof. Toshihiro Togaya

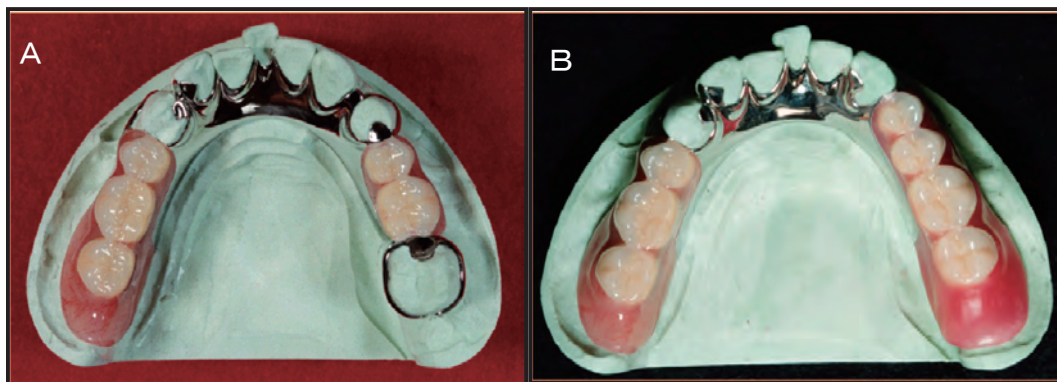
【研究概要】

歯の欠損は、歯科口腔機能の障害や低下のみならず、審美性の低下ももたらし、生活の質の低下にも結びつく。近年、高齢化に伴い、従来から用いられている義歯の需要も伸びてきている。また、欠損補綴分野でのインプラントの普及も著しいものがある。このような状況のなか、歯科補綴物の品質に対する要求はより高まってきており、特にインプラントのような人工歯根を用いた場合、その上部構造(義歯)には、高い精度が要求される。

本研究分野では、歯科補綴物に用いられる材料の成形加工法について、レーザー加工法を中心として検討し、生物学的適合性、力学的適合性および形態的適合性に優れた高精度歯科補綴物の製作システムについて研究している。また、これらの歯科補綴物製作を担当する歯科技工士の高齢化や若手技工士の離職率の高さが社会問題になりつつあり、熟練技工士の技術の伝承をいかに行うか、次世代の技工士をいかに養成するか、という社会学的問題についても検討している。

Restoration and maintenance of oral function(ingestion, mastication, swallowing and phonation)are essential for ADL (activity of daily living) and QOL (quality of life) especially in the elderly. The goal of our study is to establish the fabrication systems of precision dental prostheses, which have excellent biological-, mechanical- and morphological-compatibility.

On the other side, there is a big social problem in the manufacturing industry of the dental prostheses in Japan. The society tends to be composed by elderly dental technicians, and many young people in this field quit work because they do not feel financially stable. We are also investigating such a sociological problem.



レーザー加工によってリフォームされた義歯。鉤歯が抜歯されたため、この部分だけ義歯を作製し直し、旧義歯と接合した。これまでは一から作り直さなければならなかったものがリフォームで済み、患者の満足感も高い。

A：リフォーム前 B：リフォーム後

【業績目録】

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Shigeru Hanatani, Chikahiro Ohkubo, Ema Muraishi, Daigo Hayashi, Yukihiro Mizuno, Ai Tokue, Norio Takishin, Eiji Miura and Toshihiro Togaya: Titanium & Laser Welding –The finest combination–, 13th International College of Prosthodontists(2009. 9.10-13 Cape Town, South Africa)

2) 講演・シンポジウム

都賀谷紀宏：レーザー溶接の基礎と応用，京都府歯科医師会伏見支部学術講演会(2009.10.10 京都市)

都賀谷紀宏：歯科用レーザー溶接について－歯科技工におけるレーザー溶接利用の意義－，全国歯科技工士教育協議会&第21回日本レーザー歯学会連携講演会(2009.11.21 福岡市)

技 術 部

Division of Technical Support

【研究支援概要】

2009 年は 1 月より 12 月末までに 9 分野 171 件の利用があり、再生実験試料等の特殊な組織標本作製なども含め、個々の研究者の要望に応じてきた。

2008 年末に入れられた自動染色装置によって、標本依頼から完成までの時間が従来より短縮された。また、分野によるクレオスタット(凍結切片作製装置)の共同利用も増えた。

一方、固定、包埋から染色、封入までの病理組織標本作製や免疫染色などの技術指導もおこなってきた。

- ・パラフィン切片作製、凍結切片作製、ブロックの作製、脱灰標本の作製
- ・一般染色(Hematoxylin-Eosin stain)
- ・特殊染色(Azan stain, Alcian blue stain, Berlin blue stain, Dahl's method, Elastica-Van Gieson stain, Giemsa stain, Kluver-Barrera stain, Masson's trichrome stain, Maxwell's stain, Nissl's stain, PTAH, Toluidine blue stain, Safranin O-Fast green stain, Villanueva bone stain, von Kossa's method, Silver stain)
- ・免疫染色(α SMA, Desmin, vWF VIII, Vimentin, CD68, CD31, EP2, Collagen type-I, Type-II, MAP2, HBME-1 等)

自己研鑽として京都大学技術職員研修(専門、総合)、日本病理学会総会、実験病理組織技術研究会第 16 回総会・学術集会、第 24 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会研究発表会に参加し、情報収集や技術交流をおこなってきた。

また、衛生管理者として、労働安全衛生教育の研修を受けてきた。

【業績目録】

◆ 学会等の発表 ◆

梅澤真樹子、樋口京一、森 政之、松下隆寿、細川昌則：SAM における食事脂肪と促進老化について、第 24 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会研究発表会(2009.7.9)

張 国紅、陳 レイ、松下隆寿、付 笑影、中山 淳、樋口京一、森 政之：SAMP6 系マウスから作出された交雑仔群に認められた関節炎、第 24 回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会研究発表会(2009.7.10)

4. ナノメディシン融合教育ユニット

Nano-Medicine Merger Education Unit

ナノメディシン融合教育ユニットは、ナノテクノロジーとライフサイエンス、並びに医学が融合して初めて実現できる「ナノメディシン」という新しい先端医工学領域において、将来、産学官で活躍できる人材を育成することを目的として開設された教育組織です。

このユニットは京都大学の部局を横断した組織として位置づけられ、医学研究科、工学研究科及び再生医科学研究所が互いに連携しながら運営されます。教育においては既存の研究科・専攻という教育体系の枠組みを越えて、京都大学の豊富な教員スタッフと新たに採用された特任教員とが融合教育ユニットを形成してプログラムをコーディネートし、基礎知識、基礎技術の実習教育、研究指導に当たります。

既に産官で研究者、技術者として活躍されている社会人にナノメディシンに関する基礎知識を講義により提供するとともに、基礎実習及び演習などの実技による再教育を行います。これにより、新領域において問題解決能力をもつ人材へと育成します。

We are proud of foundation of Nano-Medicine Merger Education Unit, which is an educational organization with the aim of nurturing talented experts who can drive translational research, display issue-solving ability, and create next-generation industry in terms of “nano-medicine” generated only by merger of nano-technology, life science, and medicine.

The unit is crossing over Graduate School of Medicine, Graduate School of Engineering, and Institute for Frontier Medical Sciences to make abundant human resources of Kyoto University and new designated researchers grow together, as the result of which we can provide coordinated and fundamental education programs efficiently.

It is an ultimate goal of this unit to contribute to nurturing talent with issue-solving ability in new fields by providing practice and basic lecture about nano-medicine for experts in engineering and research in a specific field.

5. 学術集会

5-1 京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 平成21年度 学術講演会

開催日：2009年12月14日(月)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶：研究所長・教授 坂口 志文(京都大学再生医科学研究所)

セッション1

座長：開 祐司 (京都大学再生医科学研究所 副所長・教授)

「軟骨性骨形成における血管侵入抵抗性の制御」

開 祐司 教授(京都大学再生医科学研究所)

「核内受容体機能を担うエピゲノム制御因子群の機能」

加藤 茂明 教授(東京大学分子細胞生物学研究所)

「軟骨内骨化を制御する細胞とシグナル分子」

鄭 雄一 教授(東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻(医学系研究科兼任)
東京大学医学部附属病院ティッシュ・エンジニアリング部)

ポスターセッション

セッション2

座長：北村 隆行 (京都大学大学院 工学研究科・教授)

特別講演

“The Role of Multi-Cell Simulations of Biological Development, Disease, Regeneration and Tissue Engineering”

Professor James A. Glazier(インディアナ大学物理学科 バイオ複雑系研究所)

「血管網形成の数値モデル」

小林 亮 教授(広島大学大学院理学研究科)

ポスターセッション

セッション3

座長：鍋島 陽一(京都大学大学院 医学研究科・教授)

「制御性T細胞による免疫応答制御」

坂口 志文 教授(京都大学再生医科学研究所)

「死細胞の貪食と分解」

長田 重一 教授(京都大学大学院医学研究科分子生物学)

「発生・分化におけるエピジェネティック制御」

仲野 徹 教授 (大阪大学大学院医学系研究科病理学)

閉会の挨拶：副所長・教授 岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所)

京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成21年度 学術講演会

ポスターセッション

ポスター 1

還元酵素 ERdj5 を介した小胞体関連分解

潮田 亮, 寶関 淳, 永田和宏

ポスター 2

コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 は軟骨形成に重要である

真砂有作, 細矢明宏, 河野章悟, 那須 輝, 戸口田淳也, 藤田克昌, 小澤英浩, 近藤 玄, 永田和宏

ポスター 3

転写開始複合体形成過程における TBP/GAF 相互作用の解析

法邑賢一

ポスター 4

Runx1-Cbfr 転写複合体は FoxP3 陽性制御性 T 細胞の生体内抑制活性に必須である

鬼頭昭彦, 小野昌弘, 直江吉則, 大倉永也, 山口智之, 矢口浩子
北林一生, 塚田俊彦, 野村尚史, 宮地良樹, 谷内一郎, 坂口志文

ポスター 5

正常 ZAP-70 の発現量操作による自己免疫性関節炎の誘導

前田伸治*

*名古屋市立大学医学部 腫瘍・免疫内科学講座

ポスター 6

再生医療のためのサイトカインデリバリーシステム

木村 祐, 山本雅哉, ○小原洋志, 田畑泰彦

ポスター 7

非ウイルス性遺伝子導入バイオマテリアルを利用した幹細胞の生物機能改変

城 潤一郎, 山本雅哉, 田畑泰彦

ポスター 8

Bioartificial pancreas

Yuji Teramura, Hiroo Iwata

ポスター 9

Designing functional protein-incorporating hydrogels for the enhancement of neural stem cell survival

Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Koichi Kato, Hiroo Iwata

ポスター 10

The roles of tudor genes in mammalian spermatogenesis

Takashi Tanaka, Mihoko Hosokawa, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma

ポスター 11

microRNAs are actively involved in induction of pluripotent stem cells from mouse and human fibroblasts

小柳三千代

ポスター 12

The Dissection of Reprogramming Process in Induced Pluripotent Stem Cells via ECAT11 Expression

岩渕久美子

ポスター 13

胚発生における最初の血液循環にはメタロプロテアーゼによる細胞接着の解除が必要である

飯田敦夫, 坂口和弥, 佐藤洋旭, 岩木 彩, 川原敦雄, 瀬原淳子

ポスター 14

Functional Skeletal Muscle Regeneration by the Engraftment of Mesodermal Progenitors Derived from Mouse iPS Cells

桜井英俊, 坂口泰子, 酒井大史, 庄子栄美, 瀬原淳子

ポスター 15

Identification and analysis of Pax3 targets that regulate the behaviour of skeletal muscle stem cells in the dorsal somite

Takahiko Sato, Didier Rocancourt, Solveig Thorsteinsdottir, Margaret Buckingham

ポスター 16

胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫における Notch1 遺伝子部分欠損の解析

藤本真慈

ポスター 17

ヒト ES/iPS 細胞からの Xeno-free 神経誘導システム

森実飛鳥, 土井大輔, 菊地哲広, 高橋 淳

ポスター 18

パーキンソン病霊長類モデルに対する細胞移植における, ヒト ES 細胞由来の腫瘍源性について

土井大輔¹, 菊地哲広¹, 尾上浩隆³, 林 拓也³, 斎木英資², 森実飛鳥¹, 笹井芳樹⁴, 高橋 淳¹

¹ 京都大学再生医科学研究所 生体修復応用分野

² 理研分子イメージングセンター

³ 北野病院神経内科

⁴ 理研 CDB

ポスター 19

The effect of hypoxia on proliferation and differentiation properties of human bone marrow stromal cells

Yonghui Jin, Tomohisa Kato, Moritoshi Furu, Akira Nasu, Yoichiro Kajita,

Hiroto Mitsui, Michiko Ueda, Tomoki Aoyama, Junya Toguchida

ポスター 20

豚島の凍結保存における PVA バイオ人工膜の有用性

漆 智

ポスター 21

人工膜の移植部位として的大腿骨骨髓腔の有用性: 糖尿病犬における in vivo 実験

楊 凱強

ポスター 22

GPI-anchored protein fate linked to mouse sperm capacitation

近藤 玄, 渡邊仁美, 折橋 郁

ポスター 23

附属再生実験動物施設における生物試料検疫業務成績

近藤 玄, 渡邊仁美

ポスター 24

Protein kinase A enhances endothelial cell differentiation potential in vascular progenitors

○Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK

ポスター 25

マウス生殖細胞における Nanog 遺伝子のリプログラミング機能

山口新平

ポスター 26

Efficient reprogramming of primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells

長田翔伍

ポスター 27

再生医学評価法としての MRI イメージングの開発研究

東 高志

ポスター 28

幹細胞の新規凍結保存法の開発

松村和明

ポスター 29

運動器の連結システムにおけるコラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の役割

杉本由紀, 真砂有作, 永田和宏, 開 祐司, 宿南知佐

ポスター 30

軟骨性骨原基の 2 つの血管侵入障壁

滝本 晶, 西崎有利子, 開 祐司, 宿南知佐

5-2 セミナー

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2009. 1.19	池川 志郎 (独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センター)	ゲノム医科学による生活習慣病の解明 ー骨・関節疾患を例に	京都大学再生医科学 研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2009. 1.20	山田 吉彦 (NIH, USA)	Critical Roles of the Zinc-Finger Transcription Factor Epiprofin in the Development of Teeth, Epidermis, and Hair Follicles	第 144 回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分野
2009. 2.10	金城 政孝 (北海道大学大学院先端生命 科学研究院)	次世代バイオイメージングとしての蛍 光関連分光法	第 145 回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分野
2009. 2.16	Justin Ainscough (Institute for Cardiovascular Medicine, University of Leeds, UK)	Local AT1 receptor activity in adult cardiomyocytes regulates cell size and ventricular function without pressure overload	幹細胞加工セミナー	幹細胞加工研究領域
2009. 2.16	Brian Hendrich (Centre for Stem Cell Re- search, University of Cam- bridge, UK)	Transcriptional silencing and lineage commitment in mice	幹細胞加工セミナー	幹細胞加工研究領域
2009. 2.16	Qi-Long Ying (Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Uni- versity of Southern Califor- nia, USA)	27 years in the making: Germline competent rat embryonic stem cells	幹細胞加工セミナー	幹細胞加工研究領域
2009. 2.16	Eric Schulz (Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Uni- versity of Southern Califor- nia, USA)	27 years in the making: Germline competent rat embryonic stem cells	幹細胞加工セミナー	幹細胞加工研究領域
2009. 2.16	Dawn Coverly (Department of Biology, Uni- versity of York, UK)	Cyclin-dependent initiation of mam- malian DNA replication	幹細胞加工セミナー	幹細胞加工研究領域
2009. 2.16	Martin Pera (Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Uni- versity of Southern Califor- nia, USA)	Understanding and maintaining hu- man pluripotent stem cells	幹細胞加工セミナー	幹細胞加工研究領域
2009. 2.18	Andrew P. McMahon (Harvard Stem Cell Institute, Dept. of Molecular and Cellu- lar Biology, Harvard Univer- sity)	From signal to output: Sonic hedge- hog morphogen signaling	生体システム制御学・ 細胞外環境セミナー	生体システム制御 学分野
2009. 2.26	月田 早智子 (大阪大学大学院医学研究科 病理学講座)	上皮細胞間接着によるホメオスターシ ス制御と細胞増殖	再生増殖制御学分野 セミナー	再生増殖制御学分野
2009. 2.27	鄭 雄一 (東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻)	骨・軟骨再生のための高機能インプラ ントデバイスの創製	京都大学再生医科学 研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2009. 3. 6	小守 壽文 (長崎大学大学院医歯薬学総 合研究科)	Akt シグナルによる骨格形成機構	京都大学再生医科学 研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2009. 3.10	Ting Xie (Stowers Institute For Medi- cal Research, Kansas City, USA)	Stem Cells: Niche, Competition, Ag- ing and Applications	生体システム制御学・ 細胞外環境セミナー	生体システム制御 学分野
2009. 3.13	Jose Silva (Centre for Stem Cell Re- search, University of Cam- bridge, UK)	Nanog is the gateway to the pluripo- tent ground state	幹細胞加工セミナー	幹細胞加工研究領域
2009. 3.17	岩井 一宏 (大阪大学大学院生命機能研 究科)	直鎖状ポリユビキチン化: NF- κ B 活 性化に必須な新たなユビキチン修飾系	第 146 回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分野

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2009. 3.17	水島 昇 (東京医科歯科大学医歯学総合研究科)	オートファジーによる細胞内大規模分解の生理的役割と誘導シグナル	第146回細胞生物学セミナー	細胞機能調節学分野
2009. 4.10	Ernest Kelvin Manders (The University of Pittsburgh Medical Center)	What Has Happened in the Last 5 Years	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2009. 4.27	Katriina Aalto-Setälä (Internal medicine and cardiology, Regea, Institute for Regenerative Medicine, University of Tampere, and Heart Center, Tampere University Hospital, Tampere, Finland)	Human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes: To create a platform to induce differentiation and to analyze electrical properties	第15回再生誘導セミナー	再生誘導研究分野
2009. 5.22	Frederic Mercier (Stem Cell Research Department of Tropical Medicine, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii, USA)	Fractones, the adult brain stem cell and the stromal network	生体システム制御学・細胞外環境セミナー	生体システム制御学分野
2009. 6. 1	Davis Ng (National University of Singapore)	Protein quality control in the cytosol	第147回細胞生物学セミナー	細胞機能調節学分野
2009. 9.17	Renee A Reijo Pera (Center for Human Embryo and Embryonic Stem Cell Research and Education / Obstetrics and Gynecology / Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine)	Human Germ Cell Formation and Differentiation from Pluripotent Stem Cells	第16回再生誘導セミナー	再生誘導研究分野
2009.10. 5	Tangchun Wu (Huazhong University, China)	hsp27 gene variations predict risk and survival of lung cancer	第148回細胞生物学セミナー	細胞機能調節学分野
2009.10. 5	Lawrence Hightower (University of Connecticut, USA)	Hyperbaric Oxygen Therapy : healthy aging, cytoprotection and stress conditioning	第148回細胞生物学セミナー	細胞機能調節学分野
2009.10.13	Gregory Blatch (Rhodes University, South Africa)	Establishing protein folding pathways in an intracellular desert: Hsp40-Hsp70 chaperone machinery of malaria parasite-infected human erythrocytes	第149回細胞生物学セミナー	細胞機能調節学分野
2009.10.20	Roberto Sitia (Univ. Vita Salute San Raffaele, Italy)	Multistep Protein Quality Control in the Early Secretory Compartment	第150回細胞生物学セミナー	細胞機能調節学分野
2009.10.27	Lars Ellgaard (Univ. of Copenhagen, Denmark)	Regulating disulfide-bond formation in the ER of mammalian cells	第151回細胞生物学セミナー	細胞機能調節学分野
2009.12. 1	Jeffrey L. Brodsky (University of Pittsburgh, USA)	Molecular chaperones, ER associated degradation, and protein conformational diseases	第152回細胞生物学セミナー	細胞機能調節学分野
2009.12.4	Ram I. Mahato (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Tennessee Health Sciences)	Gene Expression and Silencing for Improved Human Islet Transplantation	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2009.12.18	Andras Nagy (Department of Molecular Genetics, University of Toronto/Samuel Lunenfeld Research Institute, Mt. Sinai Hospital, Toronto)	piggyBac transposition reprogrammed induced pluripotent stem cells are powerful exploratory tools	第17回再生誘導セミナー	再生誘導研究分野
2009.12.21	國府 力 (大阪大学先端科学イノベーションセンター)	トランスポゾンベクターによるマウス長距離ゲノム制御領域の探索	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2009.12.26	乾 誠 (山口大学大学院医学研究科)	インスリン様成長因子-1(IGF-1)由来ペプチドによる創傷治癒促進活用	組織修復セミナー	組織修復材料学分野

5－3 研究発表会

開催日 2009年1月16日(金曜日)
場 所 再生医科学研究所東館 5F ルーフテラス

プログラム

発表者	所属	演題名
根 来 宏 光	生体材料学分野	膀胱機能的再生を目指して
塩 谷 伊 毅	臓器再建応用分野	polyglycolic acid-collagen tube で修復したイヌ下歯槽神経の再生に星状神経節ブロックが及ぼす影響
森 実 飛 鳥	生体修復応用分野	ヒト ES 細胞から誘導した増殖可能なドーパミン神経前駆細胞
大 貫 茉 里	再生誘導研究分野	異なる2種類の遺伝子セットを用いたマウス人工多能性幹細胞の誘導／体細胞の不完全なリプログラミングに関する研究
望 月 裕 司	再生誘導研究分野	胚性幹(ES)細胞における転写因子 Klf4 の機能解析
木 戸 祐一郎	生体材料学分野	幹細胞への small interfering RNA 導入のための非ウイルス性キャリア作成
飯 田 敦 夫	再生増殖制御学分野	小型魚類ゼブラフィッシュを用いたアプローチにより, ADAM プロテアーゼの形態形成における機能を解析する
中 村 淳 一	シミュレーション医学研究領域	葉酸吸着によるタキソールの抗ガン効果の向上
後 神 秀 考	ナノバイオプロセス研究領域	一分子観察法を駆使した膜骨格構成分子としての septin の役割の解明
杉 田 守	ナノバイオプロセス研究領域	新規青色蛍光プローブシリコンナノ結晶の開発とその応用
野 田 裕 美	生体機能調節学分野	Neuropilin-1 により区分できる活性化制御性 T 細胞
石 田 義 人	細胞機能調節学分野	小胞体に蓄積する異常コラーゲンの分解

5 - 4 学術講演会・シンポジウム・研究会等

International Conference “Protein Folding and neurodegenerative disease”

Date : April 6-7, 2009

Venue : Heian Kaikan, Kyoto

Chaired by Richard Morimoto (Northwestern Univ.)

Kazuhiro Nagata (Kyoto Univ.)

Ryosuke Takahashi (Kyoto Univ.)

【Monday, April 6】

Opening remarks : Rick Morimoto (Northwestern)

Welcome remarks : Kazuhiro Nagata (Kyoto)

Session 1 : Basic biology of protein aggregation and disaggregation

Chair : Gill Bates (London) and Yukio Fujiki (Kyushu)

Toshiya Endo (Nagoya) 「From Life of Proteins to Protein Community」

Ron Kopito (Stanford) 「Cellular responses to intracellular and extracellular protein aggregates」

Rick Morimoto (Northwestern) 「Stress response and chaperone networks in neurodegenerative disease and aging」

Kazuhiro Nagata (Kyoto) 「Dynamics of aggregation and disaggregation of neurodegenerative disease-causative proteins」

Session 2 : Misfolding of SOD1 in ALS

Chair : Erich Wanker (Berlin) and Koji Yamanaka (Riken)

Hideki Nishitoh (Tokyo) 「The role of ER stress in ALS」

Dave Borchelt (Florida) 「Misfolding and aggregation of mutant SOD1 in familial ALS」

Don Cleveland (UCSD) 「Misfolding, mitochondria, and motor neuron disease」

【Tuesday, April 7】

Session 3 : Chaperone networks, protein folding, and aggregation

Chair : Ron Kopito (Stanford) and Tamotsu Yoshimori (Osaka)

Masasuke Yoshida (TITECH) 「New aspect of chaperonin mechanism」

Hideki Taguchi (Tokyo) 「Mechanism of yeast prion propagation revealed by direct observation of prion protein dynamics」

Session 4 : Mechanisms of Parkinson's disease

Chair : Don Cleveland (UCSD) and Kazuhiro Iwai (Osaka)

Nobutaka Hattori (Tokyo) 「The pathogenesis of familial Parkinson's disease」

Ryosuke Takahashi (Kyoto) 「Molecular mechanisms underlying parkin-related parkinsonism」

Makoto Kinoshita (Kyoto) 「Septins as a determinant of dopamine metabolism and alpha-synuclein aggregation」

Session 5 : New therapeutic strategies for polyglutamine diseases

Chair : Rick Morimoto (Northwestern) and Yoshitaka Nagai (NCNP)

Gill Bates (London) 「In vivo validation of HDACs as therapeutic in HD」

Nobuyuki Nukina (Riken) 「New strategy for the treatment of polyglutamine diseases」

Erich Wanker (Berlin) 「Modulating protein misfolding pathways in neurodegeneration」

Gen Sobue (Nagoya) 「Molecular targeted therapy for polyglutamine disease ; special reference to SBMA」

Closing Remarks : Ryosuke Takahashi

京都大学再生医科学研究所平成20年度共同研究会

開催日：2009年3月27日(金)

場 所：京都大学再生医科学研究所

開会挨拶

坂口 志文(京都大学再生医科学研究所教授 所長)

基調講演

岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所教授)

「30年の学際研究の経験から－共同研究と研究の独立性－」

研究報告会

久保田広志(秋田大学工学資源学部准教授)

「タンパク質品質管理機構の研究」

庭野 道夫(東北大学電気通信研究所教授)

「高感度分光法による細胞機能計測機器の開発」

白吉 安昭(鳥取大学大学院医学系研究科准教授)

「ヒト心臓ペースメーカー細胞の樹立と心疾患研究」

島田 義也(放射線医学総合研究所グループリーダー)

「胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫とNotch1遺伝子部分欠損の解析」

閉会挨拶

開 祐司(京都大学再生医科学研究所教授 副所長)

京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」第4回公開講演会

幹細胞医学から細胞治療へ

開催日：2009年9月26日(土) 午後2時00分～午後4時10分

場 所：京都大学百周年時計台記念館1階百周年記念ホール

開会挨拶

「細胞を使って病気を治す」

「幹細胞はどこにいる？～旅する血液・免疫系幹細胞と白血病」

再生医科学研究所 戸口田淳也 教授

再生医科学研究所 長澤 丘司 教授

6. 共同研究

2008 年度共同研究報告(研究期間 2008 年 11 月～2009 年 3 月)

【タンパク質品質管理機構の研究】

○研究代表者：久保田広志 准教授(秋田大学工学資源学部)

再生医科学研究所共同研究者：永田和宏 教授(細胞機能調節学分野)

○研究経過及び研究成果：

筋萎縮性側索硬化症は、タンパク質のフォールディング異常を原因とする神経細胞死によって引き起こされる神経変成疾患の一つである。この疾患の原因タンパク質の一つである superoxide dismutase 1(SOD1)変異体の培養細胞内における凝集と脱凝集のダイナミクスをタイムラプス観察法、蛍光相関分光法、蛍光エネルギー共鳴移動法、蛍光寿命顕微鏡イメージング等により解析し、SOD1 の凝集や脱凝集が可溶性の小さな集合体(オリゴマー)を介しておこることがわかった。興味深いことに、変異 SOD1 の凝集時には細胞は死なないのに対し、脱凝集時には有意な数の細胞が死んでゆくことがわかった。これらの結果は、変異 SOD1 においては、凝集時のオリゴマーと脱凝集時のオリゴマーとで、何らかの性質の違いがあり、細胞毒性が異なることを示唆している。

○研究成果の公表：

北村 朗, 久保田広志, 稲田のりこ, 松本 弦, Richard I. Morimoto, 金城政孝, 永田和宏：分光イメージング法を用いた変異型 SOD1 の凝集体形成と凝集体中間構造の解析－凝集中間体と細胞毒性の関係について－：第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会－合同大会(一般口頭発表およびポスター発表), 神戸市, 2008.12.9-12

久保田広志：タンパク質品質管理機構の研究：平成 20 年度京都大学再生医科学研究所共同研究会(口頭発表), 京都市, 2009.3.27
Akira Kitamura, Masataka Kinjo, Hiroshi Kubota and Kazuhiro Nagata: Dynamics of Aggregation and disaggregation of neurodegenerative disease-causative proteins: International Conference 'Protein folding and neurodegenerative disease' (口頭発表), 京都市, 2009.4.6-7

【生体吸収性高分子バイオマテリアルを利用した末梢神経の再生修復】

○研究代表者：中村雅也 専任講師(慶應義塾大学医学部)

再生医科学研究所共同研究者：田畑泰彦 教授(生体材料学分野)

○研究内容：

末梢神経の再生のためのゼラチンスポンジを組み込んだポリ乳酸チューブを作製し、ゼラチンスポンジからの細胞増殖因子の徐放性を評価している。さらに、動物に作製した末梢神経欠損部位へ生体吸収性 bFGF 含浸ポリ乳酸チューブを埋入、神経の再生修復を検討している。バイオマテリアルの物性ならびに細胞増殖因子の徐放性が神経再生に与える影響について調べている。

【歯周組織における Tenomodulin 機能の解明】

○研究代表者：鄭 雄一 教授(東京大学大学院工学系研究科)

再生医科学研究所共同研究者：宿南知佐 准教授(生体分子設計学分野)

○研究経過及び研究成果：

マウス歯周靭帯組織における Scx の発現を確認した。ScxGFP トランスジェニックマウスにおいて GFP 蛍光発現を指標に発現部位の特定を試みた。GFP 蛍光は自家蛍光のために観察が困難であったため、免疫染色法にて抗 GFP 抗体を用いる事で観察を試みている。Tnmd 発現は歯周靭帯の発達に合わせて発現している事が予想されるため、現在は GFP を指標として Tnmd 発現の見られる時期の周辺を検索している段階である。

【高感度分光法による細胞機能計測機器の開発】

○研究代表者：庭野道夫 教授(東北大学電気通信研究所)

再生医科学研究所共同研究者：岩田博夫 教授(組織修復材料学分野)

○研究経過及び研究成果：

Si 基板を導波路として用いた多重内部反射赤外分光法を用いて、Si 基板上の細胞の状態をリアルタイムで計測できるシステムを構築した。実際に細胞のアポトーシスを追ったところ、細胞の障害とともにアミド I と II の吸収ピークが経時的に上昇した。また、低分子薬物のフィンガープリント領域の吸収を用いると、細胞内濃度や物質変換を追跡することが出来ることを見出した。再生医療との関係では幹細胞を分化させる低分子薬物のスクリーニングに有効な機器となる。

【ヒト心臓ペースメーカー細胞の樹立と心疾患研究】

○研究代表者：白吉安昭 准教授(鳥取大学大学院医学系研究科)

再生医科学研究所共同研究者：川瀬栄八郎 NEDO 講師(発生分化研究分野)

○研究経過及び研究成果：

ヒト ES 細胞から心筋細胞、ペースメーカー細胞の樹立を目指して、ヒト ES 細胞への NKx2.5-BAC の遺伝子導入を行った。ヒト ES 細胞から拍動する心筋細胞の分化誘導に成功し、現在、NKx2.5-BAC を導入したヒト ES 細胞のセレクションが進行中である。

○研究成果の公表：

Arakawa, K., et al. Properties of cardiac pacemaker like cells isolated from mouse ES cells. 第 7 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2009 年 5 月

【*in situ* Tissue Engineering の臨床応用に関する研究】

○研究代表者：大森孝一 教授(福島県立医科大学)

再生医科学研究所共同研究者：中村達雄 准教授(臓器再建応用分野)

○研究経過及び研究成果：

所内で開発された新しい *in situ* Tissue Engineering の手法を再生医療に臨床応用する共同研究を行った。特に頭頸部外科領域への応用を目指した人工気管、人口喉頭の開発を目指して行った。ビーグル犬用の人工気管を作成した。頸部の気管を置換する実験を行い、臨床における安全性や効能を評価する為に、直径 18mm、長さ 6cm の人工気管をマーレックスメッシュとコラーゲンで作製した。今後、これを熱脱水架橋した後、体重 10kg のビーグル犬の頸部気管に埋込する予定である。

【胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫と Notch1 遺伝子部分欠損の解析】

○研究代表者：島田義也 グループリーダー(放射線医学総合研究所)

再生医科学研究所共同研究者：藤本真慈 助教(再生免疫学分野)

○研究経過及び研究成果：

X 線誘発マウス胸腺リンパ腫において、T 細胞の増殖、分化に関わる転写因子 Ikaros が高頻度(50%)で変異していることをみつけた。T 細胞の増殖・分化には Ikaros 以外に Notch1 も重要である。本研究では、X 線照射および環境化学物質 ENU により誘発されたマウス胸腺リンパ腫における Notch1 遺伝子 5' 側の特定領域の部分欠損について解析した。その結果、後者からも前者と同程度の頻度で欠損が生じていることが判明した。ENU は、点突然変異を誘発する化学物質であり、誘発されたリンパ腫に欠失が起こっていることは意外であった。また、欠失箇所の塩基配列を決定したところ、1つのリンパ腫から複数種類の Notch1 欠失が認められるケースがあった。さらに、欠損のある細胞とない細胞両方が存在している胸腺リンパ腫を見出した。これは、Notch1 の欠失は悪性増殖の過程で起こったことを意味する。これらのリンパ腫の TCRβ を解析することで、Notch1 の欠失が分化段階のいつ頃起こったのかを推測する予定である。

○研究成果の公表：

Fujimoto, S., Kakinuma, S., Kina, T., Shimada, Y. : Further V to DJ rearrangement of TCRβ gene in the presence of an in-frame VDJ construct. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会(2008.12.1-3. 京都)

藤本真慈, 柿沼志津子, 喜納辰夫, 島田義也：一頭のマウスに発生した胸腺リンパ腫の TCRβ 鎖遺伝子再構成の解析によって明らかになった 1 個の前リンパ腫細胞からの増殖と分化。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会(2008.12.9-12. 神戸)

Shang, Y., Shimada, Y., et al. Aberrant activation of interleukin-9 receptor and downstream Stat3/5 in primary T-cell lymphomas in vivo susceptible B6 and resistant C3H mice, *In Vivo*, 22(6), 713-720, 2008.

Takabatake, T., Shimada, Y., et al. Microarray-based global mapping of integration sites for the retrotransposon, intracisternal A-particle, in the mouse genome, *Nucleic Acids Research*, 36(10), e59-1-e59-11, 2008.

2009 年度共同研究課題一覧

○短期研究課題

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題
岸田 晶夫 教授 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所)	岩田 博夫 教授 (組織修復材料学分野)	生体スキャフォールドを用いた間葉系組織再生の基礎研究
西中村隆一 教授 (熊本大学発生医学研究所)	山下 潤 准教授 (幹細胞分化制御研究領域)	ES 細胞由来腎臓系細胞および血管構成細胞による三次元構造の構築
久保田広志 准教授 (秋田大学工学資源学部)	永田 和宏 教授 (細胞機能調節学分野)	タンパク質品質管理による細胞保護の研究
鄭 雄一 教授 (東京大学大学院工学系研究科)	宿南 知佐 准教授 (生体分子設計学分野)	歯周組織における Scx-Tenomodulin 機能の解明
大山 隆 教授 (早稲田大学教育・総合科学学術院)	末盛 博文 准教授 (霊長類胚性幹細胞研究領域)	DNA 高次構造のクロマチン制御能と中胚葉系細胞の分化制御機構との相関解析
白吉 安昭 准教授 (鳥取大学大学院医学系研究科)	中辻 憲夫 教授 (発生分化研究分野)	ヒト心臓ペースメーカー細胞の樹立と心疾患研究
金澤 卓弥 講師 (茨城大学農学部)	戸口田淳也 教授 (組織再生応用分野)	乳腺脂肪細胞の分子細胞生物学的性状解析および間葉系幹細胞からの分化誘導系の開発
島田 義也 グループリーダー (放射線医学総合研究所)	藤本 真慈 助教 (再生免疫学分野)	胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫と Notch1 遺伝子部分欠損の解析
若尾 宏 助教 (北海道大学大学院医学研究科)	坂口 志文 教授 (生体機能調節学分野)	霊長類 ES 細胞からの免疫制御性 T リンパ球の分化誘導
山田 源 教授 (熊本大学生命資源研究・支援センター)	瀬原 淳子 教授 (再生増殖制御学分野)	Wnt/ β カテニン, 及び Bmp シグナル因子群による間葉発生制御とプロテアーゼ因子群の機能解明

○長期研究課題(2009 年度～2011 年度)

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題
川上 浩一 教授 (国立遺伝学研究所)	瀬原 淳子 教授 (再生増殖制御学分野)	脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究
浅原 弘嗣 部長 (国立成育医療センター)	戸口田淳也 教授 (組織再生応用分野)	腱, 軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用

〈生体再建学分野（国内客員）〉

（欠員中）

■ 生体組織工学研究部門 ■

〈生体分子設計学分野〉

教授：開 祐司 准教授：宿南知佐 講師（非常勤）：近藤 淳，鄭 雄一，小守壽文，池川志郎
教務補佐員：滝本 晶 技術補佐員：杉山弘美 大学院生：杉本由紀，毛利公美，佐野寛子，島村仁子
特定研究員（学術支援）：西崎有利子 研修員：三浦重徳 外国人共同研究者：蔣 永康

〈生体材料学分野〉

教授：田畑泰彦 助教：山本雅哉 講師（非常勤）：原島秀吉，中村雅也，金田安史
事務補佐員：馬場恭子 技術補佐員：吉田久子 教務補佐員：森田美枝
大学院生：高木智紹，根来宏光，河井可奈江，岡本竜弥，平井健次郎，郡司周太郎，隅田 仁，中村陽子，古谷洋之，大野由尊，
木戸祐一郎，林健太郎，村上裕子，白井智明，戸田裕之，田島脩平 学部生：石川英史，糸岡朝樹，吉川 宗，稲生佳菜子
受託研究員：福西賢晃，川端慎吾，塚本啓司，小林はつみ 研究員（産官学連携）：上杉佳子 研究員（科学研究）：劉 健
特定研究員（学術支援）：城潤一郎 特定研究員（G-COE）：△小原洋志 民間等共同研究員：園田 浩
研究生：齊藤高志 日本学術振興会外国人特別研究員：Juthamas Ratanavaraporn 特別研究学生：浅野一成

〈組織修復材料学分野〉

教授：岩田博夫 准教授：加藤功一 講師（非常勤）：宇山良公 助教（RI センター所属）：寺村裕治
事務補佐員：鈴木義子
大学院生：陳 顯，Nguyen Minh Luan，EGAWA Edgar Yuji，小長谷周平，西垣達矢，山本寿弘，山本英樹，小村 嵩，
竹本直紘，村上隆史
研究員（産官学連携）：戸田満秋 技術補佐員：戸田範昭 研修員：児玉智信 受託研究員：藤田 聡

〈生体物性学分野（国内客員）〉

教授：鳥光慶一

■ 再生統御学研究部門 ■

〈発生分化研究分野〉

教授：中辻憲夫 NEDO 講師：川瀬栄八郎 助教：中馬新一郎 研究員（科学研究）：*細川美穂子
教務補佐員：森部江美子，*富山敦美 技術補佐員：田中ます子 事務補佐員：酒井睦美，廣富ひとみ
大学院生：田中 敬，熊谷英明

〈再生誘導研究分野〉

教授：山中伸弥 助教：中川誠人 特定拠点講師：*高橋和利，*沖田圭介，*吉田善紀
日本学術振興会特別研究員：*小柳三千代 JST 博士研究員：*前川桃子 外国人共同研究者：*Marc P. A. Lewitzky
特定研究員（WPI）：*一阪朋子，*成田 恵，*奥倉みどり
特定研究員（産官学連携）：*瀧澤奈々子，*岡田亜紀，*大亀登紀子，*大石晶子 特定研究員（NEDO）：*佐藤美子
派遣研究補助員：*飯塚富近，*小西 制，*松村泰子，*西川美里，*伊藤朋美，*大内美佳
教務補佐員：*松川ゆかり JST 技術員：*澁川 蘭 JST 派遣研究補助員：*小田中育美
派遣事務員：*竹島清佳，*波佐場春香 大学院生：三浦恭子，岩渕久美子，梶原正俊，福原晶子，田中孝之，中村友紀，
洪 炫禎，田邊剛士，大貫茉莉，島本 廉，横田日高，望月裕司，杉山逸未，村松万里江，山川達也

〈再生増殖制御学分野〉

教授：瀬原淳子 助教：栗崎知浩 特定研究員（G-COE）：△飯田敦夫
研究員（学術支援）：栗崎智美 日本学術振興会特別研究員：佐藤文規 事務補佐員：倉澤祥子
技術補佐員：黒田信子 研究員（研究機関）：高塚志保 特定拠点講師：*桜井英俊 研究員（産官学連携）：佐藤貴彦
大学院生：木村剛隆，坂口和弥，酒井大史，坂口泰子，西郷大吾，荒井宏行，岩木 彩，庄子荣美，谷米竜馬

〈再生免疫学分野〉

准教授：喜納辰夫 助教：藤本真慈

■ 再生医学応用研究部門 ■

〈生体修復応用分野〉

准教授：高橋 淳 研究員(産官学連携)：森實飛鳥 事務補佐員：五味淵淑子 技術補佐員：窪田 慶，勝川美都子
大学院生：土井大輔，菊地哲広，五味正憲，鷺田和夫，北村彰浩，吉川達也

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 講師：加藤友久 特定研究員(学術支援)：佐藤信吾
事務補佐員：安田尚代，芳野麻里絵 技術補佐員：上田路子，小林由紀子
大学院生：金 永輝，梶田洋一郎，那須 輝，三井裕人，末吉達也，笠原 崇，早川和男，玉置さくら，Elalaf Hassan，
小林恭介

〈器官形成応用分野〉

准教授：角 昭一郎 特定助教(産官学連携)：白水泰昌 講師(非常勤)：砂村真琴，日裏彰人，小林直哉
研究員(研究機関)：漆 智 事務補佐員：菊地裕子 教務補佐員：楊 凱強
研究生：星野順一 研修員：柳井伍一

〈臓器再建応用分野〉

准教授：中村達雄 講師(非常勤)：早川克己，稻田有史，堀 義生，茂野啓示，萩原明於
事務補佐員：矢延聡枝 技術補佐員：石田久恵 大学院生：小林丈士，島田英徳，木田直樹
研究生：町口敏彦，畑山敬秀，瀬川篤典，本多通孝，山本一道
研修員：井上祐利，中田 顕，市原理司 特別研究学生：塩谷伊毅

〈再生医学応用流動分野〉

(欠員中)

■ 附属再生実験動物施設 ■

施設長(兼)：長澤丘司 副施設長(兼)：戸口田淳也 准教授：近藤 玄 技術職員：出口央士，松尾美奈
技能補佐員：古卿智英，人見博子，石丸英典，細田 勝，西山尚之，柴田 豊，森本幸子，田中正行，藤田 章，竹明フサ，
向 一哲，後藤 円 技術補佐員：折橋 郁，大川実穂 教務補佐員：渡邊仁美

■ 附属幹細胞医学研究センター ■

センター長(兼)：中辻憲夫

〈霊長類胚性幹細胞研究領域〉

准教授：末盛博文 特定研究員(NEDO)：石井隆道，宮崎隆道
研究員(WPI)：*山内香織 教務補佐員：采女久実子，後藤律子 大学院生：福光 剣，武内大輝

〈幹細胞分化制御研究領域〉

准教授：山下 潤 大学院生：檜崎元太，魚崎英毅，山水康平，松永太一，夏秋政浩，福島弘之
教務補佐員：村山千里，志野瑞穂，片山志織

〈幹細胞加工研究領域〉

准教授：多田 高 特定研究員(産官学連携)：◇山口新平 外国人共同研究者：程 李涛 教務補佐員：◇福地恵美
大学院生：平野邦生，長田翔伍

〈細胞プロセッシング研究領域(客員)〉

教授：高橋恒夫 准教授：古江－楠田美保
特定研究員(特別教育研究)(CPC 主任)：高田 圭 技術補佐員：濱生麻里

〈再プログラム化研究領域（客員）〉

教授：鳥居隆三

■ 附属ナノ再生医工学研究センター ■

センター長(兼)：楠見明弘

〈ナノバイオプロセス研究領域〉

教授：楠見明弘

特任講師：*藤原敬宏

大学院生：石橋宗典，廣澤幸一朗，根本悠宇里，柴田明裕，田中賢治，Sven Rasidi，工藤恭彦，後神秀考，杉田 守，
瀧澤勇介，白居祐希，池田泰祐

民間等共同研究員：*鈴木健一，*岩沢こころ，*本田郁子，*笠井倫志，*中田千枝子，*Rahul Chadda，*渋谷周作

JST(ICORP)技術員：坪井久恵，土方博子 派遣技術員：渡辺美枝子，入江陽子

教務補佐員：*金政宏治，*入谷真由子，*木村恵理 技術補佐員：*Ankita Chadda，*宮原愛美

〈シミュレーション医工学研究領域〉

准教授：玄 丞 講師(非常勤)：南部敏之，茂木伸夫，中島直喜 特任助教：松村和明

事務補佐員：小柴里美 教務補佐員：金 学嬉，妻 庭胤

大学院生：中村淳一，加藤希理子，高山 了

特定研究員(産官学連携)：東 高志 研修員：中井隆介，野村昌代

研究生：城真理子

〈ナノバイオメカニズム研究領域〉

助教：都賀谷紀宏

〈再生医工学研究領域（外国人客員）〉

(欠員中)

■ 技術部 ■

技術専門員：松下隆壽 再雇用職員：小岸久美子

■ 事務部 ■

事務長：小山房男

専門職員(総務グループ長)：旗谷文一 主任：服部和枝 事務職員：木村 彩 事務補佐員：戸倉理恵子，杉谷香菜

専門職員(共同利用グループ長)：神田俊明 主任(兼)：三原一晃，服部和枝

専門職員(経理グループ長)：重光一夫 専門職員：馬場 勉 主任：三原一晃，西坂加奈

事務職員：勝 清香，高橋江里 事務補佐員：上村幸代，戸嶋素子，緒方康子，澤田祐紀 派遣職員：鎌田亜希子

■ ナノメディシン融合教育ユニット ■

科学技術振興助教：外波弘之，有馬祐介，中路 正 教務補佐員：中西和香

※：物質－細胞統合システム拠点所属 ◇：工学研究科所属

△：医学研究科所属

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University 2009

京都大学再生医科学研究所年報 2009

2010 年 3 月 18 日 印刷 2010 年 3 月 25 日発行

発 行 京都大学再生医科学研究所

京都市左京区聖護院川原町53 〒606-8507

印 刷 ㈱北斗プリント社
